

11 Mar

PCT/JP03/11134

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

01.09.03

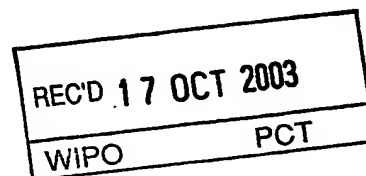
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 2 年   9 月   3 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 2 - 2 5 8 1 1 4  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 2 - 2 5 8 1 1 4 ]

出 願 人      科学技術振興事業団  
Applicant(s):

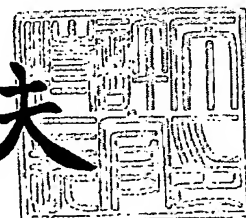


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月   2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 1 0 3 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02031

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区山手通 3 - 2 4 - 1 八事ファミリーハイツ 8 0 4 号

【氏名】 岡崎 恒子

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区原一丁目 5 0 5 アトレ原駅前 6 0 2 号

【氏名】 池野 正史

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区鶴ヶ沢 1 - 6 0 3 セジュールみどり 2 0 2 号室

【氏名】 伊藤 俊英

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100095577

【弁理士】

【氏名又は名称】 小西 富雅

【選任した代理人】

【識別番号】 100100424

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 知公

【選任した代理人】

【識別番号】 100114362

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 045908

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 哺乳類人工染色体  
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第 1 ベクターと、機能配列を含む環状の第 2 ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第 1 工程と、

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択する第 2 工程と、及び  
選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第 3 工程と、

を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。

【請求項 2】 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第 1 ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第 2 ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第 1 工程と、

形質転換体を選択する第 2 工程と、及び

選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第 3 工程と、

を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。

【請求項 3】 前記第 1 ベクターが選択マーカー遺伝子を有し、前記第 2 工程における形質転換体の選択は該選択マーカー遺伝子を利用して行われる、請求項 2 に記載の作製方法。

【請求項 4】 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、請求項 1～3 のいずれかに記載の作製方法、

5'-NTTCGNNNNANNCGGN-3'：配列番号 1（但し、NはA, T, C, 及びGのいずれかである）。

【請求項 5】 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、請求項 1～4 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 6】 前記哺乳類セントロメア配列はヒト 21 番染色体由来の 11 量体繰返しユニットを含む、請求項 5 に記載の作製方法。

【請求項 7】 前記哺乳類セントロメア配列のサイズは約 50kb 以下である、



請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 8】 前記機能配列が目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列からなる、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 9】 前記目的遺伝子はハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子である、請求項 8 に記載の作製方法。

【請求項 10】 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ I の構造遺伝子である、請求項 8 に記載の作製方法。

【請求項 11】 前記機能配列はヒト  $\beta$  グロビン遺伝子群全領域をコードする配列である、請求項 8 に記載の作製方法。

【請求項 12】 前記機能配列は、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列からなる、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 13】 前記挿入用配列が loxP サイト若しくは FRT サイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、請求項 12 に記載の作製方法。

【請求項 14】 前記第 1 工程において導入する、前記第 1 ベクターと前記第 2 ベクターの量比はモル比で約 10 : 1 ～ 約 1 : 10 の範囲にある、請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 15】 前記第 2 ベクターとして、それに含まれる機能配列が互いに異なる複数のベクターが使用される、請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 16】 請求項 1 ～ 15 のいずれかに記載の作製方法によって得られ、

哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

【請求項 17】 請求項 1 ～ 15 のいずれかに記載の作製方法によって得られ、

哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的遺伝子及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

【請求項 18】 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

【請求項 19】 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼIの構造遺伝子である、請求項 18 に記載の哺乳類人工染色体。

【請求項 20】 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

【請求項 21】 前記機能配列はヒト  $\beta$  グロビン遺伝子群全領域からなる、請求項 20 に記載の哺乳類人工染色体。

【請求項 22】 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

【請求項 23】 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

【請求項 24】 前記挿入用配列が loxP サイト若しくは FRT サイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、請求項 22 又は 23 に記載の作製の哺乳類人工染色体。

【請求項 25】 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、請求項 16 ～ 24 のいずれかに記載の哺乳類人

工染色体、

5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号 1（但し、NはA, T, C, 及びGのいずれかである）。

【請求項 26】 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、請求項 16～24 のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

【請求項 27】 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、請求項 26 に記載の哺乳類人工染色体。

【請求項 28】 前記機能配列又は前記挿入用配列を複数個有する、請求項 16～27 のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

【請求項 29】 請求項 16～28 のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する哺乳類細胞。

【請求項 30】 請求項 16～28 のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するヒト細胞。

【請求項 31】 請求項 16～28 のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するマウス ES 細胞。

【請求項 32】 請求項 1～15 のいずれかに記載の作製方法によって得られる哺乳類人工染色体又は請求項 16～28 のいずれかに記載の哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程を含む、

ことを特徴とする、前記機能配列又は前記挿入用配列が長期間安定して維持可能な状態に導入された哺乳類細胞の作製方法。

【請求項 33】 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第 1 ベクターと、機能配列を含む環状の第 2 ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第 1 工程と、

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択する第 2 工程と、

選択された形質転換体の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第 3 工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第 4 工程と、及び

分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入

する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

【請求項34】 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換体を選択する第2工程と、

選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び

分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

【請求項35】 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択する第2工程と、

選択された形質転換体の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

【請求項36】 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換体を選択する第2工程と、

選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第

3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

【請求項37】 請求項35又は36に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

【請求項38】 請求項16～28のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞から哺乳類人工染色体を分離する工程と、及び

分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

【請求項39】 請求項16～28のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞と、を融合させる工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

【請求項40】 請求項39に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

【請求項41】 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞である、請求項32、33、34、37、38、及び40のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

【請求項42】 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、

胚性生殖細胞、又は組織幹細胞を、特定の組織の細胞へと分化するように誘導してなる細胞である、請求項 32、33、34、37、38、及び 40 のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

【請求項 43】 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、哺乳類の受精卵である、請求項 32、33、34、37、38、及び 40 のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

【請求項 44】 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、サイズが約 50kb 以下の哺乳類セントロメア配列、及び選択マーカー遺伝子を含むベクター。

【請求項 45】 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、請求項 44 に記載のベクター、

5'-NTTCGNNNNANNCGGG-3'：配列番号 1（但し、NはA、T、C、及びGのいずれかである）。

【請求項 46】 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、請求項 44 又は 45 に記載のベクター。

【請求項 47】 前記哺乳類セントロメア配列はヒト 21 番染色体由来の 11 量体繰返しユニットを含む、請求項 46 に記載のベクター。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【産業上の利用分野】

本発明は哺乳類人工染色体に関する。詳しくは、哺乳類人工染色体の作製方法、哺乳類人工染色体、及び哺乳類人工染色体の利用に関する。本発明において提供される哺乳類人工染色体は、例えば所望の遺伝子を哺乳類細胞内へと運搬するためのベクターとして遺伝子治療、細胞、組織、又は哺乳類個体の形質転換等に利用することができる。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

有糸分裂において安定して維持されるヒト人工染色体（HAC(s)）は数メガbpのサイズを有し、そしていくつものCENP-Bボックスを有する線状（YAC）又は環状

(BAC又はPAC)であり、数10キロベースのヒト $\alpha$ サテライト(アルフォイド)を含む前駆体DNAコンストラクトの導入によってヒト線維芽細胞株HT1080内でしばしばde novoに形成される(Ikeno et al. 1998; Henning et al. 1999; Ebersole et al. 2000)。そのようなHAC上には必須キネトコアタンパク質が検出されるので、導入されたアルファサテライトアレイは真のヒト染色体におけるものに類似した活性型セントロメア/キネトコア構造をde novoに組み立てることができる(Ikeno et al. 1994; Ikeno et al. 1998; Henning et al. 1999; Ebersole et al. 2000; Ando et al. 2002)。HACは細胞内タンパク因子を利用して細胞周期ごとに複製されるので、HACはアルフォイド配列内に一つ又は複数の複製起点も有する。テロメア配列を有するアルフォイドYACから調製された線状のHACはその末端に機能的テロメア構造を獲得したが、BAC又はPACから調製された環状のHACはテロメア構造を有していなかった(Ikeno et al. 1998; Ebersole et al. 2000)。

#### 【0003】

遺伝子療法によるヒト疾患の治療は取り組む価値があり且つ将来有望な分野である。我々は、欠損ヒト遺伝子の修復やそれらの機能又は制御機構を詳細に特徴付けることに利用し得る数万もの遺伝子を手に行っているが、効率的な遺伝子輸送技術の開発には依然として大きな障害が存在する。哺乳動物細胞用として現在利用可能なベクターはそのほとんどが小さなウイルス由来である(Mineta et al. 1995; Fisher et al. 1997; Pfeiter & Verna 2001)。これらのベクターは所望の遺伝子(導入遺伝子)を高い効率で遺伝子導入できるという利点を有するものの、そのクローニング許容サイズは限られている。これらのベクターは小さすぎるために組織特異的制御領域を含む長いゲノム断片を挿入することができない。さらには、導入遺伝子はたいていの場合、宿主細胞の染色体内へのランダムインテグレーションの後に限って安定して維持され、そのような場合の遺伝子発現は通常予測不可能であって(ほとんどの場合は抑制される)、導入遺伝子の真の制御領域による制御は行われぬ。更に悪いことには、このような導入遺伝子を組み込むステップは好ましくない突然変異(ミュータジェネシス)を伴うことがある。

## 【0004】

一方HACは、制御領域を含み、100 kbを越える大きさのDNAからなる大きな導入遺伝子を保持する能力を備える。導入遺伝子を含むHACは、導入遺伝子及びアルフォイド配列の両者を有する前駆コンストラクトから (Mejia et al. 2001)、又はアルフォイド配列と導入遺伝子をそれぞれ別個に有した前駆コンストラクトからde novoに形成され得る (Grimes et al. 2001)。したがって、HACは治療用途におけるベクターとしてだけでなく、大きなゲノム断片を用いることによってはじめて可能となる、組織又は器官特異的な遺伝子発現制御を解析するモデルシステムとしても利用できると考えられる。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は以上の背景の下なされたものであって、その目的は哺乳類細胞内で遺伝子などの目的とする機能配列を安定的に発現させる技術を提供することである。具体的には、本発明は哺乳類細胞内で安定的に維持され、それが保持する機能配列の発現が効率的に行われる哺乳類人工染色体、その作製方法、及びそれを利用した細胞等の形質転換方法等を提供することを目的とする。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは以上の目的に鑑み、哺乳類人工染色体を人工染色体前駆体から形成させる過程で、機能配列としての目的遺伝子を取り込む方法を採用し、目的遺伝子 (GCH1遺伝子) が発現可能に保持される哺乳類人工染色体の作製を試みた。即ち、環状ベクターであるBACを人工染色体前駆体として使用し、GCH1遺伝子全体及びその上流制御領域をカバーする約180kbのゲノム領域を保持するBAC (GCH1-BAC) と、ヒトセントロメア配列として約50kb又は約100kbのアルフォイド配列を含むBAC (アルフォイドBAC) をヒト線維芽細胞であるHT1080細胞にコトランスフェクトした。その結果、GCH1遺伝子を複数コピー有するヒト人工染色体 (HAC) を構築することに成功し、得られたHACは選択操作を行わなくともヒト細胞及びマウス細胞の両者において安定して維持されることが示された。さらに検討を行ったところ、このHACを有する形質転換株においてGCH1活性の上昇が認められ



、また、その活性は染色体上に存在する場合と同様にインターフェロン $\gamma$ の誘導に応答性を示すものであった。即ち、構築されたHACから自然な状態のGCH1遺伝子の発現が確認された。

一方、線状ベクターであるYACを前駆体として使用し、BACの場合と同様の方法でヒト $\beta$ グロビン遺伝子群全領域を保持するヒト人工染色体の構築に成功した。

本発明は以上の検討の結果得られた知見に基づいてなされたものであって、以下の構成を提供する。

[1] 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択する第2工程と、及び  
選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。

[2] 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換体を選択する第2工程と、及び

選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。

[3] 前記第1ベクターが選択マーカー遺伝子を有し、前記第2工程における形質転換体の選択は該選択マーカー遺伝子を利用して行われる、[2]に記載の作製方法。

[4] 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、[1]～[3]のいずれかに記載の作製方法、

5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号1（但し、NはA, T, C, 及びGのいずれかである）。

[5] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来

の配列を含む、[1]～[4]のいずれかに記載の作製方法。

[6] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、[5]に記載の作製方法。

[7] 前記哺乳類セントロメア配列のサイズは約50kb以下である、[1]～[6]のいずれかに記載の作製方法。

[8] 前記機能配列が目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列からなる、[1]～[7]のいずれかに記載の作製方法。

[9] 前記目的遺伝子はハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子である、[8]に記載の作製方法。

[10] 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼIの構造遺伝子である、[8]に記載の作製方法。

[11] 前記機能配列はヒト $\beta$ グロビン遺伝子群全領域をコードする配列である、[8]に記載の作製方法。

[12] 前記機能配列は、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列からなる、[1]～[7]のいずれかに記載の作製方法。

[13] 前記挿入用配列がloxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、[12]に記載の作製方法。

[14] 前記第1工程において導入する、前記第1ベクターと前記第2ベクターの量比はモル比で約10:1～約1:10の範囲にある、[1]～[13]のいずれかに記載の作製方法。

[15] 前記第2ベクターとして、それに含まれる機能配列が互いに異なる複数のベクターが使用される、[1]～[14]のいずれかに記載の作製方法。

[16] [1]～[15]のいずれかに記載の作製方法によって得られ、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[17] [1]～[15]のいずれかに記載の作製方法によって得られ、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的

遺伝子及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[18] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[19] 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼIの構造遺伝子である、[18]に記載の哺乳類人工染色体。

[20] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[21] 前記機能配列はヒト $\beta$ グロビン遺伝子群全領域からなる、[20]に記載の哺乳類人工染色体。

[22] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[23] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[24] 前記挿入用配列がloxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、[22]又は[23]に記載の作製の哺乳類人工染色体。

[25] 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、[16]～[24]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体、

5'-NTTCGNNNNANNCGGG-3'：配列番号 1（但し、NはA、T、C、及びGのいずれかである）。

[26] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、[16]～[24]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

[27] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、[26]に記載の哺乳類人工染色体。

[28] 前記機能配列又は前記挿入用配列を複数個有する、[16]～[27]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

[29] [16]～[28]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する哺乳類細胞。

[30] [16]～[28]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するヒト細胞。

[31] [16]～[28]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するマウスES細胞。

[32] [1]～[15]のいずれかに記載の作製方法によって得られる哺乳類人工染色体又は[16]～[28]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程を含む、

ことを特徴とする、前記機能配列又は前記挿入用配列が長期間安定して維持可能な状態に導入された哺乳類細胞の作製方法。

[33] 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択する第2工程と、  
選択された形質転換体の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び  
分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

〔34〕 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換体を選択する第2工程と、

選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び

分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

〔35〕 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択する第2工程と、

選択された形質転換体の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

〔36〕 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換体を選択する第2工程と、

選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程

と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

[37] [35]又は[36]に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[38] [16]～[28]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞から哺乳類人工染色体を分離する工程と、及び

分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[39] [16]～[28]のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞と、を融合させる工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

[40] [39]に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[41] 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞である、[32]、[33]、[34]、[37]、[38]、及び[40]のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

[42] 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞を、特定の組織の細胞へと分化するように誘導してなる細胞である、[32]、[33]、[34]、[37]、[38]、及び[40]のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

[43] 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、哺乳類の受精卵である、[32]、[33]、[34]、[37]、[38]、及び[40]のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

[44] 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、サイズが約50kb以下の哺乳類セントロメア配列、及び選択マーカー遺伝子を含むベクター。

[45] 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、[44]に記載のベクター、

5'-NTTCGNNNNANNCGGG-3'：配列番号1（但し、NはA、T、C、及びGのいずれかである）。

[46] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、[44]又は[45]に記載のベクター。

[47] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、[46]に記載のベクター。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の第1の局面は哺乳類人工染色体（mammalian artificial chromosome）の作製方法に関し、環状ベクターを前駆体として用いる方法と線状ベクターを前駆体として用いる方法を包含する。尚、以下の説明において哺乳類人工染色体をMACともよび、これにはヒト人工染色体（human artificial chromosome；以下、「HAC」ともいう）が含まれる。

#### 【0008】

（哺乳類人工染色体の前駆体としてのベクター）

本発明では哺乳類人工染色体（MAC）前駆体として第1ベクター（環状ベクター又は酵母人工染色体）と第2ベクター（環状ベクター又は酵母人工染色体）が用いられる。第1ベクターは哺乳類セントロメア配列を含み、MACの複製及び安定的な維持に必要なセントロメアを供給し、他方、第2ベクターは機能配列を含み、MACに組込まれる機能配列の供給源となる。それに含まれる機能配列が互いに異なる複数種類の第2ベクターを使用することもできる。即ち、例えば第1ベ

クターと、それに含まれる機能配列が異なるベクターを2種類使用して本発明のMACを作製することができる。このように複数種類の第2ベクターを使用すれば、複数の機能配列が発現可能に保持されたMACを構築することが可能となる。このことは例えば、協同的に作用する複数の遺伝子などを同時に導入するためのツールとして本発明のMACを利用できることを意味する。

#### 【0009】

第1ベクター及び第2ベクターとして環状ベクター又は線状ベクターが使用される。環状ベクターとしては細菌（大腸菌など）において自律複製できるBAC (bacterial artificial chromosome) 又はPAC (Pl artificial chromosome) を用いることができる。BAC又はPACを使用することは、導入操作、増幅、維持などの取り扱いが容易であり、また様々な種類のものを入手可能であるといった利点を有する。

#### 【0010】

本発明で使用される環状ベクターは公知のBAC又はPACに必要な改変を施すことにより構築され得る。例えば、Belo-BAC (New England Biolabs inc., Beverly, MA 01915-5599) を出発材料として、これに制限酵素処理等によって哺乳類セントロメア配列の挿入部位を作製し、この挿入部位に別途用意した哺乳類セントロメア配列を挿入することにより、哺乳類セントロメア配列を含む環状ベクター（第1ベクター）を構築することができる。一方、機能配列を含むベクター（第2ベクター）は、そのクローンを含むライブラリーが提供されている場合には当該ライブラリーから調製することができる。勿論のこと、第1ベクターと同様に、公知のベクターに遺伝子工学的手法を用いて第2のベクターを作製してもよい。

#### 【0011】

線状ベクターとしては酵母内で染色体として機能するDNAコンストラクト（酵母人工染色体、以下、「YAC」ともいう）が使用される。この場合の第1ベクターは哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列を少なくとも含む。ここで、「哺乳類テロメア」とは哺乳類の染色体のテロメア領域に存在する繰返し配列をいう。ヒトテロメアは5'-TTAGGG-3'が繰返されて構成されており、ヒト人工染色体（HAC）を作製する場合にはこの配列の繰返しを含んでいるセントロメア



配列を用いることが好ましい。

### 【0012】

第1ベクター及び／又は第2ベクターが選択マーカ―遺伝子を含んでいることが好ましい。これらのベクターを用いてトランスフォーメーション（トランスフェクション）を行った際に、選択マーカ―遺伝子を利用して形質転換体を容易に選択することが可能となるからである。いずれかのベクターのみが選択マーカ―遺伝子を含んでいることがさらに好ましい。選択マーカ―の使用数を削減することにより、MACの作製あるいはその利用の過程において必要な各選択操作がより簡便化されるからである。

さらに、第1ベクターのみが選択マーカ―遺伝子を含んでいることが特に好ましい。かかる構成によれば、選択マーカ―遺伝子を利用して哺乳類セントロメア配列が適切に導入された形質転換体を選択することができ、即ち染色体として機能するDNAコンストラクトを保有する可能性の高い形質転換体を効率的に選択することが可能となる。その一方で、機能配列を含むベクター（第2ベクター）に選択マーカ―を挿入する必要がなくなることから、選択マーカ―遺伝子を含まないクローンの集合からなる市販のライブラリーから調製したベクターをそのままの状態（即ち、選択マーカ―遺伝子を挿入する操作を経ることなく）第2ベクターとして使用できるという利点も有する。加えて、第2ベクターが選択マーカ―遺伝子を含む必要がないことは、その分だけ第2ベクターに挿入できるインサートDNAのサイズに余裕ができ、結果としてより大きなサイズの機能配列を保持するMACの構築が可能となる。

### 【0013】

（哺乳類セントロメア配列）

本発明において「哺乳類セントロメア配列」とは、哺乳類細胞内においてセントロメアとして機能する配列をいう。哺乳類セントロメア配列としては、例えばヒト染色体のアルファサテライト領域由来の配列を用いることができる。ここでの「アルファサテライト領域由来の配列」とはアルファサテライト領域の一部又は全部の配列、又はこれらいずれかの配列の一部に改変を施した配列を意味する。ここでの「一部に改変」とは、対象となる配列において1若しくは複数の塩基を置換

、欠失、挿入、及び／又は付加することをいう。このような改変は複数の領域になされていてもよい。

#### 【0014】

ヒト染色体のアルファサテライト領域には一般に、5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3' (配列番号1) からなるCENP-B boxと呼ばれる配列が規則的間隔で複数個配置されている (Masumoto et al. NATO ASI Series. vol. H72, Springer-Verlag. pp 31-43, 1993; Yoda et al. Mol. Cell. Biol., 16, 5169-5177, 1996)。本発明における哺乳類セントロメア配列は、好ましくはこのCENP-B boxを高頻度に有する領域を含んでいる。

#### 【0015】

ヒト21番染色体のアルファサテライト領域由来の配列を用いることが好ましい。ヒト21番染色体のアルファサテライト領域については詳細な検討がされており $\alpha$ 21-Iと呼ばれる領域が存在する。 $\alpha$ 21-I領域はアルフォイド11量体繰り返しユニットと呼ばれる配列を備え、この繰り返しユニットでは5'-NTTCGTTGGAACGGGA-3' (配列番号2) なるCENP-B boxが規則的間隔で複数個配置されている (Ikeno et al. Human Mol. Genet., 3, 1245-1247, 1994)。

好ましくは、本発明における哺乳類セントロメア配列はこのようなアルフォイド11量体繰り返しユニットを複数有する。ヒト21番染色体のアルフォイド領域から分離され、同定された配列を配列番号3 (約25kbのアルフォイド断片) に示す。

#### 【0016】

セントロメア配列は、構築された哺乳類人工染色体において適切な機能を有するセントロメアが形成されるのに十分な長さを有する。例えば約25kb～約150kbのサイズ (例えば約50kb、約80kb、約100kb) のセントロメア配列を用いる。好ましくは約80kb以下、さらに好ましくは約50kb以下のセントロメア配列を用いる。サイズの小さなセントロメア配列を用いることは、これを含む第1ベクターの分離、精製などの操作を容易とし、またクローニング及び／又は増殖時に生じ得る脱落、改変などの確率を低下させる。ここで、後述の実施例で示されるように、環状ベクター (BAC) を用いた例において約50kbのアルフォイドDNAをセントロ

メア配列として用いた場合においてもセントロメア／キネトコア構造を適切に形成可能な人工染色体が構築されることが確認されている。同様に、線状ベクター（酵母人工染色体）を用いた例において約80kbのアルフォイドDNAをセントロメア配列として用いた場合においてもセントロメア／キネトコア構造を適切に形成可能な人工染色体が構築されることが確認されている。

#### 【0017】

哺乳類セントロメア配列は、適当なヒト細胞や、WAV17等のヒト染色体を保有する融合細胞、又はヒト以外の哺乳類細胞から調製され得る。例えば、これらの中のいずれかの細胞をアガロースプラグとして固定した後、制限酵素処理、パルスフィールドゲル電気泳動（以下、「PEGE」ともいう）等によって目的のセントロメア配列を含むDNA断片を精製、濃縮する。その後、適当なベクターにクローニングし、使用に供する。

一方、哺乳類セントロメア配列を保有するクローンを含むライブラリーを利用できる場合には、これから適宜制限酵素処理等を用いて哺乳類セントロメア配列を取得することができる。たとえば、LL21NC02ライブラリー（Lawrence Livermore Laboratory）を利用して $\alpha$ 21-Iアルフォイド断片を取得し、この断片を哺乳類セントロメア配列として使用することができる。この場合、取得した $\alpha$ 21-Iアルフォイド断片を複数用いて哺乳類セントロメア配列を構築してもよい。さらには、互いに大きさの異なる $\alpha$ 21-Iアルフォイド断片を複数取得し、これらを組合わせて哺乳類セントロメア配列を構築してもよい。

#### 【0018】

（哺乳類複製起点）

一般に哺乳類セントロメア配列内には一つ以上の複製起点が存在する。従って、通常、哺乳類セントロメア配列を含む第1ベクターには哺乳類複製起点が含まれる。使用する哺乳類セントロメア配列が哺乳類複製起点を含んでいない場合には、別途、哺乳類複製起点を第1ベクター又は第2ベクターに含有させる。但し、第2ベクターが保持する機能配列が既に哺乳類複製起点を含んでいる場合にはこの限りでない。

#### 【0019】

## (機能配列)

機能配列はそれが発現することによって特定の作用が奏される配列をいい、典型的には目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列からなる。本発明の機能配列として、それが発現することによって特定の遺伝子発現の抑制や特定のRNAの働きを抑制する等の機能を有する配列、例えばいわゆるアンチセンスRNAやリボザイムRNA等をコードする配列を用いることもできる。

目的遺伝子としては種々の遺伝子を採用することができ、ヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼI (GCH1) 遺伝子、ヒト $\beta$ グロビン遺伝子群、RBやp53などの癌抑制遺伝子、c-mycやp53などのアポトーシス誘導遺伝子、サイトカイン、各種増殖因子、抗体、腫瘍抗原等をコードする遺伝子等をその例として挙げることができる。目的遺伝子をコードする配列はゲノムDNAであってもcDNAであってもよい。

機能配列として、複数の目的遺伝子をコードする配列を含むものを用いることができる。このような配列としては、複数のタンパク質が相互作用して特定の効果が得られる場合において当該複数のタンパク質に対応する塩基配列を含むものや、一連の反応系に必要な複数の酵素に対応する塩基配列を含むものを例示することができる。このような場合には、各発現産物に対応する配列ごとにその発現を制御する配列を使用することも可能であるが、全ての発現産物或は一部（二つ以上）の発現産物の発現を一括して制御することが可能な配列を使用してもよい。例えば、複数の発現産物に対応する配列を一つのプロモーター配列の制御下に配置して構成したコンストラクトを使用することができる。

## 【0020】

目的遺伝子の配列は例えば公知のライブラリーから調製することができる。目的遺伝子（及びその制御領域）の配列を含むベクタークローンからなるライブラリーを利用可能な場合には、これから調製される目的遺伝子（及びその制御領域）の配列を含むベクターを本発明の第2ベクター（又はその作製材料）として用いることもできる。例えば、CITB (California Institute of Technology) Human BAC Libraries、RPCI-11 (Roswell Park Cancer Institute) Human BAC Library、CITB Mouse BAC Library、RPCI-22 Mouse BAC LibraryなどのBACライブラ

リーや、RPCI Human PAC Libraries、RPCI-21 Mouse PAC LibraryなどのPACライブラリー、又はCEPH Human YAC Library、Washington University Human YAC library、WI/MIT 820 YAC Library、Whitehead I Mouse YAC LibraryなどのYACライブラリー（以上、Research Genetics 社、2130 Memorial Parkway SW, Huntsville, AL 35801, US）を利用することができる。

本発明ではクローニング許容サイズの大きなベクターを使用することから、構造遺伝子に加えてその制御領域を含む大きなサイズのDNA断片を機能配列として用いることができる。ここでの制御領域は、原則的には目的遺伝子自身の制御配列（染色体で目的遺伝子の制御に直接関与している領域の配列）を意味するが、その機能が維持される限度においてこれに一部の改変を施した配列であってもよい。ここでの「一部の改変」とは、対象となる配列において1若しくは複数の塩基を置換、欠失、挿入、及び／又は付加することをいう。このような改変は複数の領域になされていてもよい。

#### 【0021】

所望の配列を特異的に挿入するための配列（本発明において、「挿入用配列」という）を機能配列として含む第2ベクターを用いることができる。このような第2ベクターを用いれば所望の配列を後から挿入可能な、汎用的な哺乳類人工染色体（MAC）を構築することができる。ここでの所望の配列とは、典型的には所望の遺伝子をコードする配列（好ましくは併せてその制御領域コードする配列を含む配列）であるがこれに限定されるものではなく、それが発現することによって特定の遺伝子発現の抑制や特定のRNAの働きを抑制する等の機能を有する配列、例えばいわゆるアンチセンスRNAやリボザイムRNA等をコードする配列であってもよい。

#### 【0022】

挿入用配列の種類は特に限定されるものではないが、loxPサイト又はFRT (Flp Recombination Target) サイト等を好適に用いることができる。例えばloxPサイトを用いれば、まずloxPサイトを有するMACが作製され、これにCreリコンビナーゼを作用させることによって部位特異的に所望の配列を導入することができ、最終的に所望の配列を含むMACが構築される。同様に、FRTサイトを有するMACを

作製した場合にはFlpリコンビナーゼを利用して最終的に所望の配列を含むMACを構築することができる。尚、loxPサイト又はFRTサイト等の一部を改変した配列であっても所望の配列を挿入する機能を有する限りにおいて挿入用配列として使用することができる。改変の例としては、その一部を削除、追加、或は置換などして導入効率を高めたり又は導入反応のみが特異的に行われるようにすることが挙げられる。

哺乳類セントロメア配列を含む第1ベクターと、機能配列としての挿入用配列を含む第2ベクターの使用割合を調整することにより、作製される哺乳類人工染色体内に組込まれる挿入用配列の数を変えることが可能である。また、このような第1ベクターと第2ベクターとの共導入によって哺乳類人工染色体を作製すれば、作製される哺乳類人工染色体においてそのセントロメアから離れた位置（即ちセントロメアに挟まれない位置）に挿入用配列を組込むことが可能であり、適切に機能する挿入配列を保持した哺乳類人工染色体が構築される。

#### 【0023】

(宿主細胞)

第1ベクター及び第2ベクターを導入する宿主細胞としては、その中で両ベクター間の組換えが行われるものが使用される。例えばヒト線維肉腫芽細胞株であるHT1080細胞、HeLa細胞、CHO細胞等を宿主細胞として使用することができる。

#### 【0024】

(哺乳類事項染色体の作製方法)

本発明の哺乳類人工染色体(MAC)の作製方法は、(1)哺乳類セントロメア配列を含む第1ベクターと、機能配列を含む第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程、(2)形質転換体を選択する第2工程、及び(3)選択された形質転換体の中からMACを保有する細胞を選択する第3工程を含む。

第1工程における第1ベクターと第2ベクターの導入方法は特に限定されるものではないが、これら二つのベクターを同時に哺乳類宿主細胞に導入することが好ましい。哺乳類宿主細胞内でのベクター間の組換えを効率的に行うためである。また、導入操作が簡便化されるからである。二つのベクターを同時に導入するためには、例えば導入操作に先立って両ベクターを混合しておき、そして宿主細

胞への導入を行えばよい。

#### 【0025】

導入に供する第1ベクターと第2ベクターの量比は、機能配列を発現可能に保持したMACが適切に形成されるように、例えば第1ベクター：第2ベクターをモル比で約10：1～約1：10とする。好ましくは第1ベクター：第2ベクターを約1：1とする。ここで、第1ベクターが少な過ぎる場合には活性のあるセントロメアを含むMACが形成されないおそれがあり、他方第2ベクターが少な過ぎる場合にはMACに機能配列が取り込まれないおそれがある。一方で、第2ベクターの量を多くすることで効率的に機能配列を取り込ませ、その結果、機能配列を複数コピー保持するMACが構築されることを期待できる。後述の実施例で示されるように、本発明の作製方法によれば目的遺伝子を複数コピー保持する哺乳類人工染色体の構築に成功している。目的遺伝子を複数コピー有するMACでは必然的に目的遺伝子の発現トータル量が多くなる。従って、本発明のMACを目的遺伝子の導入用ベクターとして使用する場合において、導入細胞内での高い発現効果が得られる。このことは本発明のMACを遺伝子治療用のベクターとして用いる場合に特に有益である。薬剤又は薬剤の候補化合物の作用・効果を評価するための材料として用いる場合においても同様に有益である。

#### 【0026】

宿主細胞への各ベクターの導入方法は特に限定されず、リポフュクシオン(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417(1984))、リン酸カルシウムを利用したトランスフュクシオン、マイクロインジェクション(Graessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370(1976))、エレクトロポレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))等の方法を採用することができる。

#### 【0027】

宿主細胞内では第1ベクターと第2ベクターとの間で組換えが生じ、その結果として第1ベクター由来のセントロメア配列と第2ベクター由来の機能配列とを備えたMACが形成される。

#### 【0028】

第1ベクターと第2ベクターを導入した後に形質転換体を選択される（第2工程）。形質転換体の選択は、第1ベクター又は第2ベクターに予め挿入しておいた選択マーカー遺伝子を利用してベクター導入後の細胞を選択的に培養することにより行うことができる。尚、両ベクターを導入後の細胞群から任意に細胞を分離した結果、分離した細胞が形質転換体である場合における当該分離する操作も本発明にいう「形質転換体の選択」に含まれる。

#### 【0029】

形質転換体を選択した後にMACを保有する細胞が選択される（第3工程）。かかる選択操作はMACに特異的なプローブや抗体などを用いた検出法によって行うことができる。具体的には、例えば第1ベクターが含む哺乳類セントロメア配列の少なくとも一部に対して特異的にハイブリダイズするプローブを用いたin situハイブリダイゼーション法によって行うことができる。この工程において第2ベクターが適切に組込まれてMACが形成されていることを確認するために、第2ベクターに特異的な配列（例えば機能配列）の少なくとも一部に対して特異的にハイブリダイズするプローブを用いて同様のハイブリダイゼーション分析を併せて行うことが好ましい。以上において使用される各プローブの検出には蛍光物質、放射性物質などを利用できる。プローブの標識に蛍光物質を用いる方法はFISH（Fluorescence in situ hybridization）法と呼ばれ、安全かつ簡便にMACを検出できる（Lawrence, J. B. et al. Cell 52:51-61, 1998; Takahashi, E. et al. Jpn. J. Hum. Genet. 34:307-311, 1989）。

第3工程に加えて、機能配列が適切に組込まれたMACが形成されていることを確認する工程を行うことが好ましい。かかる確認工程は、例えば機能配列が目的遺伝子を含む場合には当該遺伝子の発現産物を検出することによって行うことができる。

#### 【0030】

以上の作製方法で得られる哺乳類人工染色体（MAC）は非選択条件下においても極めて安定的に維持される。尚、ここでの「非選択条件」とは、MACが存在する細胞のみの生存を可能にするような選択操作を行わない条件をいう。

使用する前駆体ベクター及び宿主細胞の種類等によっても異なるものと予想さ



れるが、本発明の作製方法によれば宿主細胞へのDNAコンストラクト（第1ベクター及び第2ベクター）の導入操作後、非選択条件下、約30日経過後（約30継代後）に細胞（集団）の約95%以上にMACを保有させることが可能であり、しかもMACが1コピーのみ存在する状態を維持できる（後述の実施例を参照）。

#### 【0031】

最終的に得られる形質転換細胞（哺乳類細胞）が保有するMACの数は少ないほど好ましく、核あたり一つのMACを保有していることが特に好ましい。本発明の作製方法によれば、効率的に核あたり一つの哺乳類人工染色体を保有する形質転換細胞を得ることが可能である。

#### 【0032】

本発明の他の局面は、以上の方法によって作製される哺乳類人工染色体（MAC）を保有する形質転換体を提供する。かかる形質転換体はMACを他の細胞に移入する際の供給源として利用することができる。また、それ自身を生体に導入するなど、哺乳類人工染色体を生体内に導入するための運搬体として利用することもできる。

#### 【0033】

（哺乳類人工染色体の性質）

本発明において構築される哺乳類人工染色体（MAC）は以下の性質を備える。即ち、(1)哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列（目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列又は所望の配列を挿入するための挿入用配列）を有する、(2)哺乳類細胞中で複製される、(3)宿主細胞の染色体外に維持される、(4)細胞分裂の際に娘細胞に伝達される、及び(5)環状又は線状である。MACの形状はその作製に使用されるベクター（第1ベクター及び第2ベクター）の種類によって異なり、即ち環状ベクター（BAC又はPAC）を前駆体として用いて作製した場合はテロメア配列を含まず環状となり、他方で線状ベクター（酵母人工染色体）を用いて作製した場合にはその両端にテロメア配列を備え線状となる。哺乳類複製起点は哺乳類セントロメア配列内に存在していてもよい。

#### 【0034】

以上の諸性質を備えることにより、本発明のMACはそれが導入される哺乳類細

胞内で染色体として機能しつつ、細胞分裂の際に実質的な構造変化を伴うことなく娘細胞へと適切に分配されて維持される。

また、本発明のMACでは所望の目的遺伝子をその制御領域とともに保持させることができ、目的遺伝子を導入細胞内で効率よく発現させることができる。尚、後述の実施例で示されるように、目的遺伝子としてGCH1遺伝子を使用した例において、染色体上に存在している場合と同様の遺伝子発現が実現されている。

#### 【0035】

本発明の哺乳類人工染色体は、哺乳類細胞以外の細胞（例えば酵母細胞、大腸菌などの細菌）で自律的に複製し分配されることを可能にするDNA配列を有していてもよい。このようなDNA配列を有することにより、本発明のMACは哺乳類細胞以外の細胞においても染色体として機能する。従って、本発明のMACをシャトルベクターとして利用することが可能となる。

#### 【0036】

哺乳類セントロメア配列はCENP-B box配列を含んでいることが好ましい。CENP-B boxを高頻度にも有する領域を含んでいることが特に好ましい。さらには、哺乳類セントロメア配列がヒト21番染色体のアルファサテライト領域由来の配列、特に $\alpha$ 21-Iアルフォイド領域の配列を含んでいることが好ましい。

#### 【0037】

後述の実施例に示されるように、本発明者らはBACを前駆体として用いた系においてヒトGCH1 (EC 3.5.4.16; GCH1) をコードする約180kbの遺伝子を発現可能に保持するヒト人工染色体 (human artificial chromosome: HAC) の作製に成功している。ヒトGCH1遺伝子の一つは染色体上で14q22.1-q22.2に位置し、60kb以上に亘る6個のエクソンから構成される (図1) (Ichinose et al. 1995; Hubbard et al. 2001)。GCH1は後述の各種酵素反応での必須コファクターであるテトラヒドロピオプテリンの生合成経路における第1段階酵素であり、種々の高等生物に存在している (Nichol et al. 1985; Tanaka et al. 1989; Werner et al. 1990)。テトラヒドロピオプテリンはGCH1、6-ピルボイル-テトラヒドロプテリン合成酵素 (EC 4.6.1.10; PTPS) 及びセピアプテリン還元酵素 (EC 1.1.1.15 3 SR) による三段階の反応によってGTPから合成される。これらの酵素の中で主

要な制御ポイントはGCH1であって、その発現は転写段階においてはサイトカイン誘導の支配下にある(Werner et al. 1993)、翻訳後段階においてはフィードバック制御タンパク質であるGFRPの支配下にある。テトラヒドロピオプテリンは芳香族アミノ酸ヒドロキシラーゼ、即ち、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ(EC 1.14.16.2; PAH)、ドーパミン合成における第1段階かつ律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(EC 1.14.16.3; TH)、セロトニン生合成に関与するトリプトファン5-ヒドロキシラーゼ(EC 1.14.16.4; TPH)のナチュラル・コファクターとして機能する。テトラヒドロピオプテリンは一酸化窒素合成酵素(NOS)の三つの分子形のすべてに必須でもある(Kaufman 1993)。GCH1活性、テトラヒドロピオプテリンレベル、及び/又はTH活性の低下が黒質線状体(nigrostriatum)ドーパミンニューロンにおけるドーパミン欠乏の原因となり、そして遺伝的ドーパ応答性ジストニー(dopa-responsive dystonia: DRD、セガワ症候群)(Ichinose et al. 1994)やパーキンソニズムのようないくつかの有名な臨床的症状を引き起こす。したがって、その真の制御領域を含んだGCH1遺伝子を保持する哺乳類人工染色体はGCH1遺伝子の欠損を修復することに間違いなく有用であって、同時にin vivoにおけるGCH1の複雑な制御メカニズムについての詳細な研究を容易にするであろう。

### 【0038】

(哺乳類人工染色体の移入)

哺乳類人工染色体(MAC)の哺乳類細胞への導入は例えば次の方法で行うことができる。

まず、MACを保有する宿主細胞からMACを分離し、分離されたMACを哺乳類細胞(ターゲット細胞)に導入する。MACの分離は、例えば次の方法によって行うことができる。まずMACを保有する宿主細胞の懸濁液を調製し、そして核酸成分を抽出する。その後フィコールなどを用いた密度勾配遠心法によって染色体が含まれる画分を取得する。続いて、フィルター等を用いて分子量の小さい人工染色体を分離する。

分離されたMACを哺乳類細胞へ導入する方法としてはリポフェクション、リン酸カルシウムを利用したトランスフェクション、マイクロインジェクション、エ

レクトロポーレーションなどから適宜好適な方法を選択することができる。

#### 【0039】

細胞融合を利用した以下の方法でMACを哺乳類細胞へ導入することもできる。まず、MACを保有する宿主細胞と微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させ、続いて融合細胞の中から微小核形成能を有し且つMACを保有するハイブリッド細胞（雑種細胞）を選択する。ここで、微小核形成能を有する哺乳類細胞としては、例えばマウスA9細胞（American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209）、マウスES細胞、CHO細胞等を用いることができる。細胞融合はPEG（Polyethylene Glycol）を用いて行うことができる。目的のハイブリッド細胞の選択は、マウスA9を使用した場合を例に採れば、融合に使用した宿主細胞に特的な選択マーカーとウバインとを利用した選択培養によって行うことができる。

次に、選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる。一般的にはコルセミド処理をして微小核多核細胞を形成させ、続いてサイトカラシンB処理及び遠心処理をして微小核体を得る。

#### 【0040】

微小核体はPEGを利用した融合法等によって哺乳類細胞（ターゲット細胞）と融合される。以上の工程によって哺乳類細胞へのMACの移入（導入）が行われ、MACを保有する哺乳類細胞が得られる。

ここでのターゲット細胞としては、ヒト又は非ヒト哺乳動物の特定組織を形成する細胞（線維芽細胞、内皮細胞、心筋細胞）、生殖細胞（受精卵を含む）、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、胚性生殖細胞（embryonic germ cell：EG細胞）、組織幹細胞（造血系幹細胞、間葉系幹細胞、神経系幹細胞、骨系幹細胞、軟骨系幹細胞、上皮系幹細胞、肝幹細胞など）などが用いられる。これらの幹細胞に対して特定の組織の細胞へと分化するように誘導処理を施した細胞をターゲット細胞として用いることもできる。このようなターゲット細胞としては、例えば神経系幹細胞に血小板由来増殖因子（PDGF）、毛様体由来神経栄養因子（DNF）及びトリヨードサイロニン（T3）を用いてそれぞれニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへと分化誘導した細胞、間葉系幹細胞にデキサメタゾン及びアスコルビン酸をなどを用いて骨芽細胞へと分化誘導した細胞

、間葉系幹細胞をTGF- $\beta$ の存在下で培養して軟骨細胞へと分化誘導した細胞が挙げられる。

#### 【0 0 4 1】

ターゲット細胞へのMACの移入はin vitro、in vivo又はex vivoで行われる。例えば生体内の細胞に対して直接、哺乳類人工染色体（MAC）の移入を行うことにより、又は生体外でMACを移入した細胞を生体に導入することにより、生体を構成する所望の部位（例えば、心臓、肺等の特定の組織）にMACを導入できる。その結果、導入部位においてMACに保持された機能配列からの発現が行われる。このように、MACを外来遺伝子を生体内へと導入するためのベクターとして利用できる。MACはクローニング許容サイズが大きいことから、特に制御領域を含む大きな外来遺伝子を導入するためのベクターとして好適に利用することができる。

#### 【0 0 4 2】

より具体的には、本発明の哺乳類人工染色体（MAC）は例えば遺伝子治療用のベクターとして利用され得る。即ち、欠損遺伝子の機能補填を目的として外来遺伝子を導入することや、異常遺伝子の発現を抑制又はその発現産物の作用を抑制する目的で外来遺伝子を導入すること等に本発明のMACを利用することができる。本発明のMACはそれを導入した細胞内で安定して維持されることから、導入遺伝子が安定的、かつ長期的に発現され、優れた治療効果が期待される。また、本発明のMACを利用すれば制御領域を含んだ、サイズの大きな外来遺伝子を導入可能であるから、それを導入した細胞内で本来の制御領域に支配された遺伝子発現を行うことができる。この観点からも優れた治療効果が期待される。

#### 【0 0 4 3】

また、本発明のMACは所望の遺伝子の機能又はその作用メカニズムを解明するための手段をも提供する。特に、サイズが大きいがために従来のベクターでは遺伝子導入を行うことができなかった遺伝子の機能又は作用メカニズムを解明するための手段を提供する点で有用である。即ち、機能が未知の又は作用メカニズムが未知の遺伝子の研究手段も提供する。特に本発明のMACは、外来遺伝子をその本来の制御領域に支配された発現が可能ないように保持できることから、組織特異

的発現機構の解析や、マウスなどモデル動物個体に導入したヒト遺伝子の発現解析、阻害剤や促進剤の開発などに威力を発揮すると考えられる。

さらには、本発明のMACはトランスジェニックアニマルの作出、クローン動物の作出等にも利用され得る。

#### 【0044】

##### 【実施例】

##### <実施例1> アルフォイド-BACの構築

Belo-BACのXhoIサイトにMluI-SfiI-SacIIリンカーを挿入してpBAC-TANを作製した。pBAC-TANのNotI-HindIIIサイトに、ともにプラスチシジン(Blasticidin)S耐性遺伝子を含む断片である、pCMV/Bsd (インビトロゲン) のNotI-HindIII断片(1.3kb)又はpSV2bsr (科研製薬) のPvuII-EcoRI断片(2.6kb)を挿入することによりpBAC-CMVとpBAC-SVを作製した。LL21NC02ライブラリー (Lawrence Livermore Laboratory) から得られたコスミドクローンであるQ25F12をSfiI消化及びpBAC-TANのSfiIサイトへクローニングすることによって約25kbの $\alpha$ 21-Iアルフォイド断片( $\alpha$ 25:配列番号3)を単離した。その結果得られた、アルフォイド配列がタンドム状に配列されてなる50kb又は100kbのアルフォイドインサートを含んだアルフォイド-BACをMluI及びSacIIで消化し、続いてアルフォイド断片をpBAC-CMV又はpBAC-SVのMluI-SacIIサイトにそれぞれ挿入することにより、50kb又は100kbのアルフォイド断片を含むアルフォイド-BACであるSV/ $\alpha$ 50及びCMV/ $\alpha$ 100を構築した(図3)。

#### 【0045】

##### <実施例2> GCH1遺伝子座を含むHACの形成

ヒト21番染色体由来の11量体高次繰り返しユニット(11 monomer repeating units:モノマー繰り返しユニット)(Ikeno et al. 1994)からなる $\alpha$ 21-IアルフォイドをHT1080細胞に導入することによって効率的にHACを作製することが可能である(Ikeno et al. 1998)。本実施例ではアルフォイド-BAC及びGCH1-BACを利用して、GCH1遺伝子座を含み、正常に制御された遺伝子発現をする複数のHACを作製した。本実施例で使用したBACを図3に示した。CMV/ $\alpha$ 100は100kbの $\alpha$ 21-Iアルフォイド配列と選択マーカーとしてのCMV-Bsdを含み、そしてSV/ $\alpha$ 50は50

kbの $\alpha$ 21-Iアルフォイド配列とSV2-Bsr選択マーカを含み、上述の方法でそれぞれ構築された。GCH1-BACはBACライブラリー (Genome systems) から取得され、それはGCH1遺伝子を含む180kbのゲノムDNA断片を有する。尚、BAC-DNAの精製はCsCl密度勾配遠心法により行った。

いずれかのアルフォイド-BACとGCH1-BACをモル比で1:1となるようにHT1080細胞にリポフェクションでコトランスフェクトし、形質転換細胞を選択した。具体的には、リポフェクタミン (ギブコ BRL) を使用して0.5 $\mu$ gのアルフォイド-BACと1.0 $\mu$ gのGCH1-BAC (186L09、ゲノムシステム) をHT1080 ( $5 \times 10^5$ ) にコトランスフェクションした。尚、この操作は製品使用説明書に従って行った。形質転換した細胞を4 $\mu$ g/mlのプラスチシジンS (BS、科研製薬) で選択し、10日後にコロニーを採取した。

#### 【0046】

染色体外分子としてHACが存在していることを検出するために、 $\alpha$ 21-IアルフォイドDNAとBACベクターをプローブとして用いたFISH法でBS-耐性細胞株を分析した。具体的には、メタノール/酢酸 (3:1) による固定化後のメタフェイズ・スプレッド (分裂中期染色体) をスライドガラス上に調製し、常法にしたがってFISHを行った。HACを検出するために、プローブとしてビオチン標識 $\alpha$ 21-IアルフォイドDNA (11-4) (Ikeno et al. 1994) 及びジゴキシゲニン標識Belo-BACを用いた。この二色FISHにおいてはビオチン標識DNAをFITC結合アビジンによって可視化し、他方ジゴキシゲニン標識DNAをTRITC結合抗ジゴキシゲニン (ペーリンガー マンハイム) によって可視化した。ツァイス顕微鏡に設置したCCDカメラを用いて写真撮影した。IPLab及びAdobe Photoshop 6.0を用いてイメージ加工した。

#### 【0047】

FISHの結果、CMV/ $\alpha$ 100及びGCH1-BACのコトランスフェクションによって得られた16の形質転換細胞株の中の1つ (HT/GCH2-10) 、及びSV/ $\alpha$ 50及びGCH1-BACのコトランスフェクションによって得られた17の形質転換細胞株の中の3つ (その中の一つはHT/GCH5-18) は、分析した細胞の95%以上においてHACのコピーを核あたり一つ有していた。残りの細胞株では、導入されたBACがHT1080の染色体に

組込まれるか、又はFISH解析においてシグナルが検出できないものであった。

#### 【0048】

構築されたHACがGCH1遺伝子のゲノム断片を含むか否かを検討するために、HACを含む4つの細胞株に対してGCH1遺伝子のエクソン1及びエクソン4～6に対するプローブ（図3）をハイブリダイズさせた。エクソン1用のプローブにはエクソン1を含む13kbのビオチン標識断片を、エクソン4～6用のプローブにはエクソン4、5及び6を含む8kbのジゴキシゲニン標識断片を用いた。

#### 【0049】

CMV/ $\alpha$ 100及びGCH1-BACのコトランスフェクションによって得られたHT/GCH2-10細胞株内のHAC上、及びSV/ $\alpha$ 50及びGCH1-BACのコトランスフェクションによって得られたHT/GCH5-18細胞株内のHAC上において両プローブのシグナルがそれぞれ検出された（図4）。これらのHAC上に検出されたGCH1シグナルはHT1080の染色体上の内在性遺伝子のそれよりも強いものであった。HT/GCH2-10及びHT/GCH5-18のいずれにおいても導入遺伝子がHT1080の染色体内に組込まれたのは少数の細胞（5%未満）であったので、これらの細胞株は核あたり一コピーのHACを保有するようにサブクロニングして、それ（サブクロニングした細胞株）を更なる検討の対象として用いた。

#### 【0050】

<実施例3> HACのセントロメア／キネトコア構造及び有糸分裂における安定性

HACのセントロメア／キネトコア構造を調べるために、必須セントロメア／キネトコアタンパク質であるCENP-A及びCENP-E (Palmer et al. 1991; Yen et al. 1991; Howman et al. 2000) の存在をHT/GCH2-10及びHT/GCH5-18のメタフェイズ・スプレッドを用いて間接免疫蛍光法で調べた。尚、間接免疫蛍光法は次のように行った。まず、低張処理及び1%パラホルムアルデヒド固定化細胞を抗CENP-A抗体 (Ando et al. 2002) 又は抗CENP-E (Santa Cruz) 抗体とともにインキュベートした。各抗体の局在についてはFITC結合抗マウスIgGで可視化した。次のFISH解析分析のために、処理後の細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定し、続いてメタノール／酢酸（3:1）で固定した。



間接免疫蛍光法による分析の結果、一对の姉妹染色分体に対応して対を形成するようにCENP-Aシグナル及びCENP-Eシグナルが各HAC上に検出され、そしてそのようなシグナルはすべての内在性染色体のセントロメアにおいても同様に検出された（データ示さず）。

#### 【 0 0 5 1 】

次に、選択を行わない条件下におけるHT/GCH2-10細胞株及びHT/GCH5-18細胞株が保有するHACの有糸分裂における安定性を検討した。HACの安定性は、それを保有する細胞を非選択条件下で約30日間培養することにより評価した。具体的には、BS選択を行わない条件下、培養10日後、20日後及び30日後の各細胞株からメタフェイズ・スプレッドを調製し、HACの存在をFISHで分析した。サンプル日毎に各細胞株から調製された50個の伸展染色体を分析し、HACを保有する細胞の割合を決定した。HACの損失割合は次の式によって計算した。即ち、 $N_n = N_0 \times (1-R)^n$ 、但し、 $N_0$ は選択条件下においてHACを保有するメタフェイズ・スプレッドの数、 $N_n$ は非選択条件下、培養n日後においてHACを保有するメタフェイズ・スプレッドの数である。尚、FISH解析は上述の方法と同様に行った。

#### 【 0 0 5 2 】

非選択条件下、培養30日後において、HT/GCH5-18の分裂中期細胞の95%が、またHT/GCH2-10の分裂中期細胞の80%がHACを保有しており、HACのコピー数が非選択条件下で一つに維持された。いずれも細胞株においても宿主染色体への組み込みは観察されなかった。非選択条件下、培養30日後においてHACを保有する細胞の割合を基に一日当たりの染色体損失を算出した。HT/GCH5-18及びHT/GCH2-10におけるその値は、それぞれ0.2%及び0.5%であった。これらの結果は、各細胞株においてHAC上に活性のあるセントロメア／キネトコア構造が形成され、各HACが有糸分裂を通して安定に維持されたことを示すものである。

#### 【 0 0 5 3 】

##### <実施例 4> HACのDNA構造

HT/GCH2-10内及びHT/GCH5-18内の各HACが環状であるか線状であるかを決定するために、プローブとしてテロメア配列及びBACベクターを用いてFISHを行った。HAC上にテロメアシグナルは検出されず、他方でBACベクターのプローブでは染

色された。これに対して、宿主細胞であるHT1080由来の染色体の末端ははっきりとした斑点状に染色された。予想された通り、BAC由来HACは環状構造であると考えられた。

#### 【 0 0 5 4 】

次に、HT/GCH2-10、HT/GCH5-18、及びトランスフェクションを行っていないHT1080細胞からそれぞれ単離したDNAを制限酵素処理することによりHACのDNA構成を分析した。各ゲノムDNAサンプル (5  $\mu$ g) をBamHI又はStuIで4時間消化した後、常法に従ってゲル電気泳動に供した。そしてゲル内のDNAをナイロン膜に転写した後、GCH1エクソン6 (2.1kb) から調製された<sup>32</sup>P標識DNAプローブ (エクソン6プローブ) 及びGCH1の上流領域 (1.4kb、GCH1-BACでの位置595-1959) から調製された<sup>32</sup>P標識DNAプローブ (USプローブ) をハイブリダイズさせた。

#### 【 0 0 5 5 】

その結果、USプローブによって検出されたBamHI断片のサイズは、内在性GCH1遺伝子由来のものが5.0kb、GCH1-BAC由来のものが3.5kbであった。これら5.0kb及び3.5kb断片はHT/GCH2-10及びHT/GCH5-18から調製されたDNAにおいてほぼ等しいシグナル強度で検出された (図 5 (A))。一方、エクソン6プローブによって検出されたStuI断片のサイズは、内在性GCH1由来のものが24.5kb、GCH1-BAC由来のものが14.4kbであった。これら24.5kb及び14.4kb断片はHT/GCH5-18から調製されたDNAにおいてほぼ等しいシグナル強度で検出されたが、一方でHT/GCH2-10から調製されたDNAについては内在性GCH1由来の断片に加えてサイズが異なる3種類の断片が検出された (図 5 (B))。これらの結果は、本実施例において使用したHT1080細胞の核型が3nであるので、HT/GCH5-18内のGCH1保有HACがトランスフェクトされたGCH1-BAC DNAの約3コピーの集合によって構築されたことを示唆するものであり、一方でHT/GCH2-10ではGCH1エクソン6の末端領域において再配列が生じ、しかしUSプローブによって認識されたバンドの強度によって判断されるように、おそらくGCH1-BACを3コピー保有していることを示唆するものである。HT/GCH2-10内のGCH1転写産物をRT-PCRで分析したところ、GCH1遺伝子の内部再配列が確認された (データ示さず)。

#### 【 0 0 5 6 】

HT/GCH2-10とHT/GCH5-18内のGCH1-BAC及びアルフォイドBACのコピー数をGCH1エクソン6及びBACベクターをそれぞれプローブとして用いたドットハイブリダイゼーションによって決定した。HACに含まれる各BACの相対コピー数についてはハイブリダイゼーションのシグナル強度値から推定した。ここでの各シグナル強度値については各DNAプローブを用いて決定し、0.1ngのGCH1-BAC DNAのシグナル強度値を基準にして標準化した(図6)。GCH1エクソン6をプローブとして用いた場合には、HT/GCH2-10及びHT/GCH5-18から調製されたDNAでは0.5 $\mu$ gで、またHT1080から調製されたDNAでは1 $\mu$ gで0.1ngのGCH1-BAC DNAと等しいハイブリダイゼーション強度値を示した(図6左欄)。本研究で使用したHT1080の核型が3nであるのでHT1080の染色体内においてGCH1遺伝子が3コピー存在し、そしてHT1080から調製したDNAのシグナル強度値と等しい値がHT/GCH2-10及びHT/GCH5-18から調製した場合には半量のDNAで得られたという結果を考えれば、HT/GCH2-10及びHT/GCH5-18はGCH1遺伝子を6コピー(即ち、染色体上及びHAC上にそれぞれ3コピー)含有しなければならない。BACの合計コピー数をBACベクタープローブを用いて得られた強度値から推定した。HT/GCH2-10及びHT/GCH5-18から調製されたDNAでは0.33 $\mu$ gで0.1ngのGCH1-BAC DNAと等しいハイブリダイゼーション強度値を示した。一方予想されたように、HT1080から調製されたDNAではシグナルが検出されなかった(図6右欄)。それ故に、両HACはGCH1遺伝子のコピー数のおおよそ3倍のBACベクターのコピー数を有する。したがって、全BACベクターのコピー数は細胞あたり約9のはずである。即ち、GCH1遺伝子の3コピーはGCH1-BACのかたちで存在し、BACの残りの6コピーは両HACにおいてアルフォイドBACのかたちで存在しているはずである。

#### 【0057】

##### <実施例5> HAC保有細胞株のマウスA9細胞への導入

クローン化したアルフォイドDNAを使用することによる、HACのde novoがヒト線維芽細胞株であるHT1080内で成功している。神経細胞株におけるGCH1遺伝子の正常な発現を確認するためには、HT1080内に構築されたHACを神経細胞株内に導入する必要がある。

微小核体介在性染色体導入(MMCT)(Fournier et al. 1997)を可能とするた

めにHAC保有細胞株 (HT/GCH5-18) とマウスA9細胞株をPEGを用いて融合した。即ち、HAC保有細胞株 ( $5 \times 10^5$ ) 及びマウスA9細胞 ( $5 \times 10^5$ ) を共培養し、そしてPEG/DMSO溶液 (シグマ) 内で融合させた。続いてBS及びウワバイン (Ouabain) 耐性細胞をそれぞれBS ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) 及びウワバイン ( $3 \mu\text{M}$ ) で選択し、BS及びウワバイン耐性細胞株をFISHで分析した。HAC及びヒト染色体を同定するためにそれぞれBACベクタープローブ及びAlu反復配列プローブをメタフェイズ・スプレッドにハイブリダイズさせた (図7 (A))。結果、融合細胞株の一つであるF/GCH5-18は8-10個のヒト染色体とともにHACのコピーを1又は2以上含んでいた。

#### 【0058】

各融合細胞内のHACは非選択条件下で有糸分裂を通して安定して維持され、一日あたりの染色体損失は約1%であった (データ示さず)。マウス細胞株内でのヒト染色体の有糸分裂における安定性は、時として、マウス染色体のセントロメアに位置し、機能的セントロメア配列として作用すると考えられているマイナーサテライトDNAを融合に供されるマウス細胞から獲得することによって得られる (Shen et al. 1997)。そこで、HAC上のマウスマイナーサテライトDNAの存在の有無をFISHで調べた。HAC上にマイナーサテライトDNAのシグナルは検出されず、一方でマウス染色体のセントロメアでは強いシグナルが検出された (図7 (B))。融合細胞株はコルセミド処理の条件で微小核体 (マイクロセル) を形成することが可能であった (データ示さず)。それ故に、HACは神経細胞株に導入可能であると考えられる。

#### 【0059】

このうちの1細胞株 (TT2/GCH2-10-1) がES正常な形態、核型を示したのでキメラマウス作製を開始した。HACが保有する大きなゲノム断片内の導入遺伝子からの正常に制御された遺伝子発現が期待された。HAC形成に使用されたGCH1-BACはGCH1エクソン1の5'側上流領域から始まる100kbを越えるゲノム配列を含んでいた。そこで、HT1080及びHACを保有するその派生株におけるGTPシクロヒドロラーゼI (GCH1) 活性を測定した。先の報告によれば、線維芽細胞株におけるGCH1活性はほとんど検出されないが、IFN- $\gamma$  の誘導によってその活性は上昇するであろうと予測された (Werner et al. 1990)。そこで、HT1080、HT/GCH2-10及びHT/GCH5-

18におけるGCH1活性をIFN- $\gamma$ の存在下及び非存在下で分析した(図2)。尚、GCH1活性の測定手順は次の通りとした。IFN- $\gamma$ 非含有又は含有(250U/ml)の培養液を用いて48時間各細胞を培養した。培養後の細胞をトリプシン処理し、その後PBS(phosphate-buffered saline)で洗浄し、続いて0.3M KCl、2.5mM EDTA、及び10%グリセロールを含む0.1M Tris-HCl(pH 8.0)に溶解した。GCH1活性の測定は既述の方法(Hibiya et al. 2000)に従った。

#### 【0060】

GCH1-HACを保有しないHT1080ではIFN- $\gamma$ 誘導をしない条件においてGCH1活性はかろうじて検出できるレベルであった。一方、その活性はIFN- $\gamma$ の添加によって15倍に上昇した。HT/GCH2-10細胞株ではIFN- $\gamma$ 誘導をしない条件において、HACを保有しないHT1080の検出値の3倍のGCH1活性が認められた。IFN- $\gamma$ 誘導後は30倍近くの活性の上昇がみられた。これに対してHT/GCH5-18ではIFN- $\gamma$ の非存在下においてGCH1活性は70倍にまで上昇し、IFN- $\gamma$ を添加することで更に約5倍の活性の上昇がみられた。いずれのHT/GCH-HAC細胞株においてもその程度は異なるもののGCH1活性の上昇が認められ、これは染色体構造及び／又はHAC内のDNA再配列における相違を反映したものであると考えられる。また、両HT/GCH-HAC細胞株は依然としてIFN- $\gamma$ 誘導に感受性であって、それは真の染色体上のGCH1遺伝子の発現における応答性と同様であった。

#### 【0061】

以上の実施例で示したように、アルフォイド-BAC及びGCH1-BACを約1:1のDNA割合で用いた簡易なコトランスフェクション法によって、GCH1遺伝子(GCH1-HAC)を含む大きなDNA断片を含有したHACを得ることに成功した。このGCH1-HACはテロメアを含まない環状構造にも拘わらず、非選択条件下、30継代以上の後においても1コピーが存在する状態に維持された。これはHACが細胞周期ごとに一度複製され、そして正確に娘細胞に分配されることを示唆するものである。HACはサイズがメガベース(cytologically megabases in size)であって、トランスフェクトされたBAC DNAよりも約10倍大きい。

#### 【0062】

HACの特性及びそのde novo形成のメカニズムを調べるためにHACのDNA構造を分

析した。BACコンストラクトではレアカッター（制限酵素）切断部位のほとんど全てがメチル化されること、及び使用される細胞株が内在性のGCH1遺伝子座を含むことから、GCH1遺伝子の全領域を対象とした制限酵素分析は困難であった。それ故に、我々はBACベクターとGCH1遺伝子座との連結部位に相当する領域を対象に制限酵素分析を行った。その結果、得られた二つの細胞株内のGCH1-HACはその構成分子としてGCH1-BACを3コピーとアルフォイド-BACを6コピー含有していた（図5、6）。HAC形成の正確なメカニズムは不明であるが、GCH1-HACは導入したDNAの多量体から構成され、これは導入分子としてアルフォイド-YAC又はアルフォイド-BACのみ（データ示さず）を用いて形成されたHAC（Ikeno et al. 1998）に類似するものであった。HACの形成の際に別個のBACの会合（集合）を伴うという事実は、BAC分子の多量体化がBAC DNA自身の増幅に加えて非特異的組換えに媒介され得ることを示唆した。

#### 【0063】

大きなヒトゲノムDNAを含むHACの形成については、過去に140kb又は162kbのHPRT遺伝子座を使用した例が報告されている（Grimas et al. 2001; Mejia et al. 2001）。彼らは相補性に依存するHAT培地内においてHPRT遺伝子欠損HT1080細胞株内にHPRT遺伝子を含むHACを得ている。組織及びステージ特異的な発現をする遺伝子（即ちハウスキーピング遺伝子ではない遺伝子）に対してはこのようなアプローチのHT1080細胞における実現性は低いであろう。本実施例によればBACに挿入された50kb程度の小さな $\alpha$ 21-IアルフォイドDNAによってHAC（セントロメア／キネトコア）を形成できることが示され、一方で50%のHACが導入遺伝子を含んでいたことから、選択マーカーを有しない大きな導入遺伝子を含有するBACを効率的にHACに組込むことができることが示された。したがって、50kbのアルフォイドDNAを含むアルフォイド-BACと、直ちに利用可能なBACライブラリーをそのまま利用することにより、大きな所望のゲノム領域を含むHACを形成することが可能であるといえる。導入遺伝子が完全な状態であることはHACの形成の後に確認されるであろう。

#### 【0064】

CMVプロモーター支配下のBsd遺伝子を有する形質転換体の選択はBS耐性細胞の

数を増加させるが、HAC又は宿主染色体上への組込みに対するFISHシグナルは多くの形質転換体で検出されなかった(図1)。アルフォイド及びBACベクター配列をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーション分析によって、これらの細胞株は染色体のみに組込まれたBsd遺伝子を保有することが示唆された。したがって、高発現プロモーターによって発現される様に組込まれた選択マーカーは、HAC保有細胞株のスクリーニング用としては好ましいものではないと言える。

#### 【0065】

遺伝子発現は染色体構造の影響を受ける。染色体への導入遺伝子の組み込みの結果、位置効果による斑入り(PEV)(Karpen 1994)として一般に知られている現象であるジーンサイレンシングがしばしば起こる。最近の分子学的解析によって、リジン9上のヒストンH3のメチル化がHP1のクロマチンへのターゲティングの原因となり、そしてヘテロクロマチン化及び遺伝子発現の抑制が引き起こされることが報告されている(Platero et al. 1995; Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001)。酵母及びハエにおいてセントロメア/キネトコア又はその近隣におけるジーンサイレンシングも報告されており(Karpen & Allshire 1997)、このようなジーンサイレンシングは哺乳類細胞でも生ずるものと予測された。最近本発明者らは、HACのアルフォイド配列内にひとたびセントロメア/キネトコア構造が形成されると、たとえ高発現プロモータの制御下であってもHAC内に組込まれた短いマーカー遺伝子の発現が強く抑制されることを示した(Abe et al. 投稿中)。したがって、HAC内で導入遺伝子を発現させようと思えば、セントロメア/キネトコア構造との関係においてトポロジ的な問題を解決する必要がある。

#### 【0066】

HACからのGCH1遺伝子の発現はGCH1遺伝子座又はその近隣のクロマチン構造と相互に関連しているのかもしれない。そこで本発明者らはセントロメア/キネトコア構造がアルフォイド配列部分にのみ形成されたのか、それともGCH1遺伝子座内へと広がったのかを検証した。CENP-Aは機能的セントロメア/キネトコアに必須のタンパク質であって、セントロメア特異的ヌクレオソームのヒストン成分を

構成するので (Paler et al. 1991; Howman et al. 2000)、我々はHACのクロマチン構造を抗CENP-A抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法 (Ando et al. 2002) で分析した。ChIP法は次のように行った。まず、HT/GCH5-18細胞株 ( $5 \times 10^7$ ) の核を単離し、WB (20mM HEPES (pH 8.0)、20mM KCl、0.5mM EDTA、0.5mM ジチオスレイトール、0.05mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド) に溶解した。MNase消化後、可溶化されたクロマチンを既述の方法 (Ando et al. 2002) に従い抗CENP-A抗体で免疫沈降した。

HeLa細胞及びHT1080細胞を使用したそのような分析において全免疫沈降DNA中の60~80%がアルフォイド配列に富んでいた。抗CENP-A抗体を用いた分析の結果、全免疫沈降DNA中においてGCH1-HAC内のアルフォイド配列は豊富に存在することが認められたが、GCH1領域はほとんど存在していなかった。これに対してアルフォイド配列からおよそ3kb離れて存在するBACベクター配列もまた免疫沈降され、これによってアルフォイド配列部分にセントロメア/キネトコア構造が形成され、周囲のアルフォイド配列でない領域に拡がったことが示唆された (データ示さず)。セントロメア/キネトコア構造がHAC内のGCH1遺伝子座に侵入することは、おそらく上流制御配列に備えられる未知の制御メカニズムによって阻止されたものと考えられる。

#### 【 0 0 6 7 】

GCH1遺伝子はテトラヒドロビオプテリンの生合成経路における、第1段階かつ律速酵素をコードし (Nichol et al. 1985)、当該酵素は芳香族アミノ酸ヒドロキシラーゼ (PAH、TH、TPH) 及び一酸化窒素シンターゼのコファクターであって高等生物に存在する (Kaufma 1993)。GCH1遺伝子はドーパ応答性ジストニア (DRD/セガワ病) (Ichinose et al. 1994) におけるドーパミン欠損の原因遺伝子である。TH遺伝子の突然変異とともにGCH1遺伝子の欠損が生ずると重篤な初期段階ジストニア/パーキンソニズムが引き起こされる (Ichinose et al. 1999)。

#### 【 0 0 6 8 】

ヒト及びマウスのGCH1遺伝子上流制御配列についてはこれまでのところ限られた数の解析が行われたにすぎないが、CCAATボックス及びTATAボックスが保存されていることが報告されている (Ichinose et al. 1995; Hubbard et al. 200



2)。様々なげっ歯類及びヒト細胞においてGCH1遺伝子の発現がIFN- $\gamma$ によって誘導され得ることが確認されている (Werner et al. 1990)。しかしながら、IFN- $\gamma$  のシグナル伝達を含んだ正確なメカニズムは未知のままである。

#### 【0069】

ヒト $\beta$ グロビン等いくつかの遺伝子の発現は、安定した組織特異的な開クロマチン構造の開始及び維持を担う遺伝子座調節領域 (LCR) によって制御されることが知られている (Festentein et al. 1996; Milot et al. 1996)。本実施例で使用したGCH1-HACはGCH1遺伝子を含む180kbのゲノム断片を保持し、それ故に組織特異的発現のため及び近隣セントロメアによる発現抑制効果を防ぐために必要な制御配列を含んでいると考えられる。上述のように、本発明者らはIFN- $\gamma$  の存在下及び非存在下においてHACからのGCH1遺伝子の発現をGTPシクロヒドロラーゼ活性を指標に測定した (図2)。IFN- $\gamma$  の非存在下では、HAC保有細胞株であるHT/GCH2-10のGCH1活性はHT1080のそれよりもほんの少し高いものであった。また、IFN- $\gamma$  の添加によってGCH1活性は約30倍上昇した。もう一つの細胞株であってHT1080の2倍の数のGCH1遺伝子を保有するHT/GCH5-18のGCH1活性はIFN- $\gamma$  非存在下においてHT1080のそれよりも70倍高いものであった。そしてその活性はIFN- $\gamma$  誘導によってさらに5倍上昇した。上述のようにGCH2-10 HAC上のGCH1遺伝子のいくつかは構造的異常を有することが示唆されたので、HT/GCH2-10とHT1080との間の僅かな活性の相違は完全なGCH1遺伝子のコピー数が少ないことに対応するものであると考えられる。これらの結果によって、GCH1の遺伝子発現はHACにおけるGCH1遺伝子座に構築されるクロマチン構造の違いに影響を受ける一方で、GCH1遺伝子の発現は依然としてIFN- $\gamma$  に応答性を有することが示された。しかしながら、IFN- $\gamma$  誘導後の最終GCH1活性レベルは細胞株間で同等であった。このことはGCH1活性を適当な範囲内に維持するための複雑な細胞内制御システムが存在することを示唆するものである。in vivoにおけるGCH1発現の複雑な制御メカニズムを理解するためにGCH1-HACは好適なシステムであると言える。

#### 【0070】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターはヘルパーウイルス依存的増殖感染による遺伝子治療用として頻用される。AAVベクターのクローニング許容サイズは通

常、遺伝子発現に必要なそれ自身の制御配列を含まないcDNAを運搬するために十分なものに限られている (Dong et al. 1996)。GCH1はチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 及び芳香族Lアミノ酸デカルボキシラーゼ (AADC) とともに効率的なドーパミン生産に必須の酵素である。線状体においてAAVからこれら三つの酵素を発現させることによって、霊長類パーキンソン病モデルにおいて比較的長期の行動回復が認められている (Muramatsu et al. 2002)。

最近、エプスタイン・バーウイルス (EBV) ベースのエピソーム状ベクターは限られた哺乳類細胞株に対してHPRT遺伝子 (115kb) を導入する能力があり、導入された遺伝子の発現は抑止されなかったとの報告がなされた (Wade-Martins et al. 2000)。しかしながらEBVベースのベクターは非選択条件下ではHACよりも急速に失われていき、その複製はウイルストランスアクチベータであるEBNA1の存在に依存する。したがって、臨床的遺伝子治療におけるEBVベクターの安全性についてはさらなる検討が必要である。HACは上記の遺伝子導入用ベクターについての問題を解決し得るものであり、さらに安全性の面でも有利なものである。本実施例において大きなゲノム遺伝子座を保持したHACは染色体外において維持され、調節された遺伝子発現を長期にわたって示した。それ故にTH、AADC及びGCH1を含有するHACはパーキンソン病の有望な治療戦略を提供し得る。

しかしながら、BACを利用したHACのde novo形成がそれほど効率的に行われないうこと、HAC形成のための特定の細胞株が必要であること、及びHACのサイズが大きいことから、細胞又は組織の必要な部位にHACを輸送することには困難が伴う。HACを遺伝子導入ベクターとして簡便に利用するためにはHT1080内に構築されたHACが適当な細胞株内へと導入されなければならない。HACは微小核体 (ミクロセル) の形成を可能とするマウスA9細胞を用いたMMCTによって導入することができる (Fournier et al. 1997)。上述の実施例に示したように、本発明者らは非選択条件下でHACの検出し得る構造変化を伴うことなく有糸分裂においてHACを安定的に維持するマウスA9細胞株を樹立することに成功した。このHACはA9細胞株から他の細胞株へと容易に導入可能であると考えられる。

#### 【0071】

以上の実施例により、GCH1遺伝子をそれ自身の制御領域とともに保持するHAC

をGCH1-BAC及びアルフォイド-BACのコトランスフェクションによって構築できることが示された。このGCH1-HACは制御された状態でGCH1遺伝子を発現し、したがってin vivoでGCH1の制御メカニズムを研究するための好適なシステムであることが証明された。GCH1-HACについての更なる研究によって、セントロメア／キネトコアを構築するのに最低限必要なアルフォイド配列の数、GCH1遺伝子の制御された状態での発現に必要な上流領域の構造、及び制御領域における転写因子の活性部位が明らかにされるであろう。本実施例で得られた結果はモデル動物又は臨床試験において将来GCH1-HACが遺伝子運搬ツールとして有用であることをも示すものである。

#### 【0072】

<実施例7> 酵母人工染色体（YAC）を用いたヒト人工染色体（HAC）の構築  
前駆体としてYACを用いてヒト11番染色体の $\beta$ グロビン遺伝子群（クラスター）全領域を保持するヒト人工染色体を以下の手順で構築した。使用した前駆体YACは次の通りである。

##### （7-1）前駆体YAC

A201F4.3：ヒト $\beta$ グロビン遺伝子座を有する150kbのYACであって、A201F4の右腕部を改変しPGKneorが挿入されている（Keiji Tanimono, Douglas Engelより供与、Nucleic Acid Research, 27; 3130-3137）。

7c5hTEL：ヒト21番染色体アルフォイド領域由来の約80kbのアルファサテライト配列（ $\alpha$ 21-I）及びマーカー遺伝子のSVbsrを含み、その両端に酵母テロメア配列を備えかつその内側にヒトテロメア配列を備える人工染色体前駆体YACである。7c5hTELを保有する酵母（*Saccharomyces cerevisiae* EPY 305-5b  $\alpha$ 7C5hTEL）は1996年8月14日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現在は独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番3号 中央第6）に寄託されており（受託番号FERM BP-5625）、7c5Htelはこの酵母株から調製される。尚、当該酵母株の作製方法については特表2000-517182号公報を参照されたい。

F61：HT-1080にpTet-OFF（CLONTECH）を導入し、G418選択により樹立したテトラサイクリン誘導発現系細胞である。

## 【 0 0 7 3 】

## ( 7 - 2 ) 酵母人工染色体の精製

以下の手順でPulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) を施行して2種類の酵母人工染色体 (A201F4.3及び7c5hTEL) をそれぞれ分離した。PFGEはGene Navigator (Amersham Pharmacia Biotech) を使用し、0.7%アガロースゲルにおいて0.5xTBE、180 Volt及び15 second pulseの条件で15時間行った。PFGEゲルより分離したYAC DNAを電気泳動により1%低融点アガロースゲルに移し、このゲルを10mM Tris(pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaClの緩衝液に16時間浸漬した。YAC DNA(0.3  $\mu$ g/0.3ml)に100  $\mu$ gのE. coli tRNAを加えて70℃で10分間加温してゲルを融解し、続いて30Uの  $\beta$  agarase(Sigma)を加えて42℃で2h反応させることによりアガロースを消化した。これらにPFGEを施行して7c5hTEL (90kb) 及びA201F4.3 (150kb) のバンドを確認した (図 8 (A)) 。

## 【 0 0 7 4 】

## ( 7 - 3 ) YACの導入

精製した7c5hTEL及びA201F4.3を各0.3  $\mu$ g混和した後、Superfect(Qiagen)を60  $\mu$ l加えて穏やかに混和し、室温で10分間反応させた。反応後の溶液をF61細胞に添加した。培養液 (10% FBS(Trace Scientific Ltd., Noble Park, Australia) in D-MEM:Dulbecco's Modified Eagle Medium(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)) を90分後に一度交換した。72時間後より8  $\mu$ g/mlのブラスチジシン (Blasticidin) S添加培地で耐性株を選択的に培養し、形質転換株を分離した。その結果、19個の形質転換株が得られた。

## 【 0 0 7 5 】

## &lt;実施例 8&gt; 形質転換株に対する細胞遺伝学的解析

得られた形質転換株に $\alpha$ 21-Iプローブ (アルフォイドプローブ、配列番号3のDNA断片をジゴキシゲニン標識したもの) 及びYACの腕部のプローブ (pYAC5ベクター (Dr. Maynard V. Olson (Washington University)) をXhoIで切断して得られる約8kbのDNA断片 (配列番号4) をビオチン標識したもの) を用いてFISH法を施行した。その結果1個の形質転換株においてミニ染色体の形成が認められ、そしてこのミニ染色体に $\alpha$ 21-I及びYACの腕部の両方のシグナルが確認された (図

8 (B))。残りのクローンでは宿主染色体上にシグナルがみられるか、又は全くシグナルが検出されないかのいずれかであった。

一方、ミニ染色体が形成された形質転換株に対してヒト  $\beta$  グロビンクラスター非コード領域の互いに異なる部位をそれぞれ認識する3種類のプローブ (配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 7) を用いてFISH法を施行したところ、ミニ染色体上に各プローブからのシグナルが示された (図 9)。尚、各プローブはA201 F4.3を鋳型として以下のプライマーでPCR反応 (96℃30秒、58℃40秒、72℃10分を1サイクルとした25サイクル) を行い、その結果増幅されたDNAをビオチン標識したものである。

配列番号 5 のプローブ用プライマー

センス：aagaccagatagtagcaggcctggctac (配列番号 1 0)

アンチセンス：aagattattcaaggttactatgaacacc (配列番号 1 1)

配列番号 6 のプローブ用プライマー

センス：tgctaattgcttcatctagaaacttatatcctttaattc (配列番号 1 2)

アンチセンス：tttcactcgagccaaccaggaattcggcagttac (配列番号 1 3)

配列番号 7 のプローブ用プライマー

センス：gtgtaagaagggttctctagaggctctacagatagggag (配列番号 1 4)

アンチセンス：aagcagcacttgactcgagtattttatacatgctctac (配列番号 1 5)

また、テロメア反復配列 (配列番号 8 の配列が繰り返されてなる約500bpの配列) をジゴキシゲニン標識したものをプローブとして行ったFISH法ではミニ染色体上に2点又は4点のテロメアのシグナルが認められた (図 1 0)。

以上の結果から、アルファサテライト配列を有する人工染色体YACとヒト  $\beta$  グロビンクラスター全領域を有する人工染色体YACとをHT-1080細胞に導入することによって、ヒト  $\beta$  グロビンクラスター全領域を保持するミニ染色体 (ヒト人工染色体) を構築できることが確認された。

#### 【 0 0 7 6 】

<実施例 9> ファイバーFISHを用いた、ミニ染色体のマクロ構造の解析

各 $1 \times 10^6$ 個のマウスA9細胞とミニ染色体保有細胞を培養皿に播種し、これに50% PEG(SIGMA)を3ml添加して1分間培養した。続いて $10 \mu\text{M}$ のウバイン (Oubain),

5  $\mu$ g/mlのプラスチジン(Blasticidin) Sを含む選択培地で培養し、ウワバイン及びプラスチジンS耐性の形質転換株を取得した。上述の方法と同様にFISH法を施行したところ、得られた形質転換株の中にミニ染色体を保有し、かつ残りの染色体がマウス由来である形質転換株の存在が認められた。この形質転換株に対してアルフォイドプローブ(配列番号3)及び $\beta$ グロビンプローブ(配列番号5、配列番号6、及び配列番号9の混合)を用いてFISH解析を行った。尚、配列番号9のプローブはA201F4.3を鋳型として以下のプライマーでPCR反応(96℃30秒、58℃40秒、72℃10分を1サイクルとした25サイクル)を行い、その結果増幅されたDNA断片をビオチン標識したものである。

センス: gtatacatatcacctgaatatg (配列番号16)

アンチセンス: tgtaggctgaagacgttaaaagaaacac (配列番号17)

FISH解析の結果、アルファサテライト配列のシグナルがミニ染色体以外の染色体上に認められなかったため(図11)、ミニ染色体のアルファサテライト配列に対するファイバーFISH解析が可能であった。そこで、ファイバーFISH解析を行ったところ、ミニ染色体上にグロビンとアルフォイド配列の複数のシグナルが不規則に並んでいることが確認された(図12)。

#### 【0077】

本発明は、上記発明の実施の形態の説明に何ら限定されるものではなく、特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

#### 【0078】

本明細書における引用文献を以下に列挙する。

Ando, S., Yang, H., Nozaki, N., Okazaki, T. & Yoda, K. (2002) CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2229-2241.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., et al. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.

Ebersole, T.A., Ross, A., Clark, E., et al. (2000) Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats. *Hum. Mo. Genet.* 9, 1623-1631

Dong, J.Y., Fan, P.D. & Frizzell, R.A. (1996) Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* 7, 2101-2112.

Festentein, R., Tolaini, M., Corbella, P., et al. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science* 271, 1123-1125.

Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haeker, S.E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E. & Wilson, J.M. (1997) Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nature Med.* 3, 306-312.

Fournier, R.E.K. & Ruddle, F.H. (1977) Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 319-323.

Grimes, B.R., Schindelhauer, D., McGill, N.I., et al. (2001) Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome. *EMBO Rep.* 2, 910-914.

Henning, K.A., Novotny, E.A., Compton, S.T., et al. (1999) Human artificial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 592-597.

Hibiya, M., Ichinose, H., Ozaki, N., et al. (2000) Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B. Biomed. Sci. Appl.* 740, 35-42.

Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., et al. (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 1148-1153.

Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., et al. (2002) The Ensembl genome database project. Nucl. Acids Res. 30, 38-41.

Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., et al. (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. Nature. Genet. 8, 236-242.

Ichinose, H., Ohye, T., Matsuda, Y., et al. (1995) Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. J. Biol. Chem. 270, 10062-10071.

Ichinose, H., Suzuki, T., Inagaki, H., Ohye, T. & Nagatsu, T. (1999) Molecular genetics of dopa-responsive dystonia. Biol. Chem. 380, 1355-1364.

Ikeno, M., Masumoto, H. & Okazaki, T. (1994) Distribution of CENP-B boxes reflected in CREST centromere antigenic sites on long-range alpha-satellite DNA arrays of human chromosome 21. Hum. Mol. Genet. 3, 1245-1257.

Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., et al. (1998) Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. Nature Biotechnol. 16, 431-439.

Karpen, G.H. (1994) Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 281-291.

Karpen, G.H. & Allshire, R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. Trends Genet. 13, 489-496.

Kaufman, S. (1993) New tetrahydrobiopterin-dependent systems. Annu. Rev. Nutr. 13, 261-286.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. Nature 410, 116-120.

Mejia, J.E., Willmott, A., Levy, E., Earnshaw, W.C. & Larin, Z. (2001) Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. Am. J. Hum. Genet. 69, 315-326.



Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., et al. (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87, 105-114.

Mineta, T., Rabkin, S.D., Yazaki, T., Hunter, W.D., & Martuza, R.L. (1995) Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature Med.* 1, 938-943.

Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., et al. (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum. Gene Ther.* 13, 345-354.

Nichol, C.A., Smith, G.K. & Duch, D.S. (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 729-764.

Ota, A., Yoshida, S., Nomura, T., Matsui, S., Hagino, Y., Umezawa, K., Katoh, S. & Nagatsu, T. (1996) Tetrahydrobiopterin biosynthesis enhanced by lipopolysaccharide stimulation in murine neuroblastoma cell line N1E-115. *J. Neurochem.* 67, 2540-2548.

Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H. & Margolis, R.L. (1991) Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 3734-3738.

Pfeifer, A. & Verma, I.M. (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2, 177-211

Platero, J. S., Hartnett, T. & Eissenberg, J. C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* 14, 3977-3986.

Shen, M.H., Yang, J., Loupart, M.L., Smith, A., Brown, W. (1997) Human mini-chromosomes in mouse embryonal stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1375-82.

Tanaka, K., Kaufman, S. & Milstein, S. (1989) Tetrahydrobiopterin, the

cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5864-5867.

Wade-Martins, R., White, R.E., Kimura, H., Cook, P.R. & James M.R. (2000) Stable correction of a genetic deficiency in human cells by an episome carrying a 115 kb genomic transgene. Nature Biotechnol. 18, 1311-1314.

Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Fuchs, D., et al. (1990) Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. J. Biol. Chem. 265, 3189-3192.

Werner, E.R., Werner-Felmayer, G. & Wachter, H. (1993) Tetrahydrobiopterin and cytokines. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 203, 1-12.

Yen, T.J., Compton, D.A., Wise, D., et al. (1991) CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. EMBO J. 10, 1245-1254.

【 0 0 7 9 】

#### 【発明の効果】

本発明によれば、目的遺伝子に加えてその本来の制御領域をも含む巨大なDNA領域を保持する哺乳類人工染色体が提供される。従って、哺乳類人工染色体に保持された遺伝子から本来の制御様式で遺伝子発現を行うことができる。

本発明の哺乳類人工染色体は、これを他の細胞に移入したり、或は胚性幹細胞などを経て個体レベルでの研究にも使用できる。従って、組織特異的遺伝子発現、経時的遺伝子発現の研究やモデル動物を使用したヒト型遺伝子の研究、薬剤（阻害剤、促進剤など）の開発などに極めて有用なツールとなる。また、遺伝子治療用のベクターとしても有用である。このように、本発明の哺乳類人工染色体は、目的遺伝子に加えてその本来の制御領域をも含む巨大なDNA領域を運搬するための単純かつ一般的な方法を提供するものである。

【 0 0 8 0 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

&lt;120&gt; Mammalian artificial chromosome

&lt;130&gt; P02031

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 17

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;222&gt; (1)..(17)

&lt;223&gt; Human chromosome centromere region

&lt;400&gt; 1

nttcgnnnna nncgggn 17

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;222&gt; (1)..(17)

&lt;223&gt; Human chromosome 21 centromere region

<400> 2

nttcgttgga aacggga 17

<210> 3

<211> 1868

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(1868)

<223> Human chromosome 21 centromere region

<400> 3

aattcaaata aaaggtagac agcagcattc tcagaaattt ctttctgatg tctgcattca 60  
actcatagag ttgaagattg ctttcatag agcaggtttg aaacactctt tctggagtat 120  
ctggatgtgg acatttggag cgctttgatg cctacggtgg aaaagtaa atcttcata 180  
aaaacgagac agaaggattc tcagaaacaa gtttgtgatg tgtgtactca gctaacagag 240  
tggaaccttt ctttttacag agcagctttg aaactctatt tttgtggatt ctgcaaattg 300  
atatttagat tgctttaacg atatcgttgg aaaagggaa atcgtcatac aaaatctaga 360  
cagaagcatt ctcaaaact tctttgtgat gtgtgtcctc aactaacaga gttgaacctt 420  
tcttttgatg cagcagtttg gaaacactct tttttagaa actgtaagt gatatttgga 480  
tagcttaac gatitcgttg gaaacgggaa tatcatcatc taaaatctag acagaagcac 540  
tattagaaac tacttggtga tatctgcatt caagtcacag agttgaacat tcccttactt 600  
tgagcacgtt tgaaacactc ttttggaaga atctggaagt ggacatttgg agcgctttga 660  
ctgcctttgt tgaaaaggaa acgtcttcca ataaaagcca gacagaagca ttctcagaaa 720  
cttgttcgtg atgtgtgtac tcaactaaaa gagttgaacc tttctattga tagagcagtt 780  
ttgaaacact ctttttgtgg attctgcaag tggatatttg gattgctttg aggatttcgt 840  
tggaagcggg aattcgtata aaaactagac agcagcattc ccagaaattt ctttcggata 900  
tttcattca actcatagag atgaacatgg ctttcatag agcaggtttg aaacactctt 960  
ttttagttt gtggaagtgg acatttcgat cgccttgacg cctacggtga aaaaggaaat 1020

atcttcccat aaaaatagac agaagcattc tcagaaactt gttggtgata tgtgtctcaa 1080  
ctaacagagt tgaactttgc cattgataga gagcagtttt gaaacactct ttttgtggaa 1140  
tctgcaagtg gatatttgga tagcttggag gatttcgttg gaagcgggaa ttcaaataaa 1200  
aggtagacag cagcattctc agaaatttct ttctgatgac tgcattcaac tcatagagtt 1260  
gaacattccc tttcatagag caggtttgaa acactctttc tggagtatct ggatgtggac 1320  
atttggagcg ctttgatgcc tatggtgaaa aagtaaataat cttcccataa aaacgagaca 1380  
gaaggattct gagaaacaag tttgtgatgt gtgtactcag ctaacagagt ggaacctctc 1440  
ttttgatgca gcagtttgga aacactcttt ttgtagaaac tgtaagtgga tatttggata 1500  
gctctaataa tttcgttgga aacgggaata tcatcatcta aaatctagac agaagccctc 1560  
tcagaaacta ctttgtgata tctgcattca agtcacagag ttgaacattc gctttcttag 1620  
agcacgttgg aaacactctt tttgtagtgt ctggaagtgg acatttggag cgctttgatg 1680  
cctttggtga aaaaggaat gtcttcccat aaaaactaga cagaagcatt ctcagaaact 1740  
tgtttttgat gtgtgtaccc agccaaagga gttgaacatt tctattgata gagcagtttt 1800  
gaaacactct ttttgtggaa aatgcaggtg gatatttgga tagcttggag gatttcgttg 1860  
gaagcggg 1868

<210> 4

<211> 8286

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe for an  
arm region of YAC

<400> 4

ttctcatggt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa 60  
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg 120  
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg cttggttatg ccggtactgc cgggcctctt 180  
gcgggatatc gtccattccg acagcatcgc cagtcactat ggcggtgctgc tagcgctata 240  
tgcgttgatg caatttctat gcgcaccggt tctcggagca ctgtccgacc gctttggccg 300

ccgcccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgcga tcatggcgac 360  
cacacccgtc ctgtggatca attcccttta gtataaattt cactctgaac catcttggaa 420  
ggaccggtaa ttatttcaaa tctctttttc aattgtatat gtgttatgtt atgtagtata 480  
ctctttcttc aacaattaaa tactctcggt agccaagttg gtttaaggcg caagacttta 540  
atttatcact acggaattcc gtaatcttga gatcgggcgt tcgatcgccc cgaggagattt 600  
ttttgttttt tatgtcttcc attcacttcc cagacttgca agttgaaata tttctttcaa 660  
gggaattgat cctctacgcc ggacgcatcg tggccggcat caccggcgcc acaggtgcgg 720  
ttgctggcgc ctatatcgcc gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc 780  
tcatgagcgc ttgtttcggc gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg 840  
gcgccatctc cttgcatgca ccattccttg cggcggcggt gctcaacggc ctcaacctac 900  
tactgggctg cttcctaattg caggagtcgc ataagggaga gcgtcgaccg atgcccttga 960  
gagccttcaa ccagtcagc tccttcgggt gggcgcgggg catgactatc gtcgccgcac 1020  
ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca 1080  
ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat 1140  
tcggaatctt gcacgccctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgccacc aaacgtttcg 1200  
gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccgacgc gctgggctac gtcttgctgg 1260  
cgttcgcgac gcgaggctgg atggccttcc ccattatgat tcttctcgct tccggcggca 1320  
tcgggatgcc cgcgttgagc gccatgctgt ccaggcaggt agatgacgac catcagggac 1380  
agcttcaagg atcgctcgcg gctcttacca gcctaacttc gatcactgga ccgctgatcg 1440  
tcacggcgat ttatgccgcc tcggcgagca catggaacgg gttggcatgg attgtaggcg 1500  
ccgccctata ccttgtctgc ctccccgct tgcgtcgcgg tgcattggagc cgggccacct 1560  
cgacctgaat ggaagccggc ggacacctgc taacggattc accactcaa gaattggagc 1620  
caatcaattc ttgcggagaa ctgtgaatgc gcaaaccaac cttggcaga acatatccat 1680  
cgcgctccgc atctccagca gccgcacgcg gcgcatcccc ccccccttt caattcaatt 1740  
catcattttt tttttattct tttttttgat ttcggtttct ttgaaatttt tttgattcgg 1800  
taatctccga acagaaggaa gaacgaagga aggagcacag acttagattg gtatatatac 1860  
gcatatgtag tgttgaagaa acatgaaatt gccagattt cttaaccaa ctgcacagaa 1920  
caaaaacctg caggaaacga agataaatca tgtcgaaagc tacatataag gaacgtgctg 1980  
ctactcatcc tagtcctgtt gctgccaagc tatttaatat catgcacgaa aagcaaacia 2040

acttgtgtgc tt cattggat gttcgtacca ccaaggaatt actggagtta gttgaagcat 2100  
taggtcccaa aatttgttta ctaaaaacac atgtggatat ctgactgat tttccatgg 2160  
agggcacagt taagccgcta aaggcattat ccgccaagta caatttttta ctcttcgaag 2220  
acagaaaatt tgctgacatt ggtaatacag tcaaatgca gtactctgcg ggtgtataca 2280  
gaatagcaga atgggcagac attacgaatg cacacgggtgt ggtgggcca ggtattgtta 2340  
gcggtttgaa gcaggcggca gaagaagtaa caaaggaacc tagaggcctt ttgatgttag 2400  
cagaattgtc atgcaagggc tccctatcta ctggagaata tactaagggt actgttgaca 2460  
ttgcgaagag cgacaaagat tttgttatcg gctttattgc tcaaagagac atgggtggaa 2520  
gagatgaagg ttacgattgg ttgattatga caccgggtgt gggtttagat gacaaggag 2580  
acgcattggg tcaacagtat agaaccgtgg atgatgtggt ctctacagga tctgacatta 2640  
ttattgttgg aagaggacta ttgcaaagg gaagggatgc taaggtagag ggtgaacgtt 2700  
acagaaaagc aggctgggaa gcatatttga gaagatgcgg ccagcaaac taaaaactg 2760  
tattataagt aaatgcatgt atactaaact cacaattag agcttcaatt taattatatac 2820  
agttattact cgggcgtaat gatttttata atgacgaaaa aaaaaaatt ggaaagaaaa 2880  
gggggggggg gcagcgttgg gtcctggcca cgggtgcgca tgatcgtgct cctgtcgttg 2940  
aggaccggc taggctggcg gggttgcctt actggttagc agaatgaatc accgatacgc 3000  
gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaaa acgtctgcga cctgagcaac aacatgaatg 3060  
gtcttcgggt tccgtgttc gtaaagtctg gaaacgcgga agtcagcgcc ctgcaccatt 3120  
atgttccgga tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct gtggaacacc tacatctgta 3180  
ttaacgaagc gctggcattg accctgagtg atttttctct ggtcccgcg catccatacc 3240  
gccagttgtt taccctcaca acgttcagt aaccgggcat gttcatcatc agtaaccgt 3300  
atcgtgagca tcctctctcg tttcatcgggt atcattaccc ccatgaacag aaattcccc 3360  
ttacacggag gcatcaagt accaaacagg aaaaaaccgc ccttaacatg gcccgttta 3420  
tcagaagcca gacattaacg ctcttgaga aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg 3480  
cagacatctg tgaatcgctt cacgaccag ctgatgagct ttaccgcagc caagcttatac 3540  
cctcgagggc tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 3600  
cccgagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag ccgctcagg 3660  
cgcgtcagcg ggtgttgcg ggtgtcggg cgagccatg acccagtcac gtagcgatag 3720  
cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat 3780

atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 3840  
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 3900  
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 3960  
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 4020  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4080  
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 4140  
cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 4200  
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcaagtcgg ttaggtcgt tcgctccaag 4260  
ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 4320  
cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 4380  
aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 4440  
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 4500  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 4560  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 4620  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaagggt tttgggtcatg 4680  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac 4740  
atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 4800  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 4860  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac 4920  
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 4980  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 5040  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc 5100  
gtggtgtcac gctcgtcgtt tgggtatggc tcattcagct ccggttcca acgatcaagg 5160  
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tcctccgatc 5220  
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaatcatgg ttatggcagc actgcataat 5280  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 5340  
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat 5400  
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 5460  
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 5520



cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 5580  
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc 5640  
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 5700  
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 5760  
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 5820  
acgaggccct ttcgtcttca agaattaatt cggtcgaaaa aagaaaagga gagggccaag 5880  
agggagggca ttggtgacta ttgagcacgt gagtatacgt gattaagcac acaaaggcag 5940  
cttggagtat gtctgttatt aatttcacag gtagttctgg tccattgggtg aaagtttgcg 6000  
gcttgacagag cacagaggcc gcagaatgtg ctctagattc cgatgctgac ttgctgggta 6060  
ttatatgtgt gcccaataga aagagaacaa ttgaccgggt tattgcaagg aaaatttcaa 6120  
gtcttgtaaa agcatataaa aatagttcag gcactccgaa atacttggtt ggcgtgtttc 6180  
gtaatcaacc taaggaggat gttttggctc tggatcaatga ttacggcatt gatatcgctc 6240  
aactgcatgg agatgagtcg tggcaagaat accaagagtt cctcggtttg ccagttatta 6300  
aaagactcgt atttcaaaaa gactgcaaca tactactcag tgcagcttca cagaaacctc 6360  
attcgtttat tcccttgttt gattcagaag cagggtgggac aggtgaactt ttggattgga 6420  
actcgatttc tgactgggtt ggaaggcaag agagccccga aagcttacat tttatgttag 6480  
ctgggtggact gacgccagaa aatgttgggtg atgcgcttag attaaatggc gttattgggtg 6540  
ttgatgtaag cggaggtgtg gagacaaatg gtgtaaaaga ctctaacaaa atagcaaatt 6600  
tcgtcaaaaa tgctaagaaa taggttatta ctgagtagta tttatttaag tattgtttgt 6660  
gcacttgcct gcaggccttt tgaaaagcaa gcataaaaga tctaaacata aaatctgtaa 6720  
aataacaaga tgtaaagata atgctaaatc atttggcttt ttgattgatt gtacaggaaa 6780  
atatacatcg caggggggttg acttttacca ttccaccgca atggaatcaa acttgttgaa 6840  
gagaatgttc acaggcgcat acgctacaat gacccgattc ttgctagcct tttctcggtc 6900  
ttgcaaacaa ccgccggcag cttagtatat aaatacacat gtacatacct ctctccgtat 6960  
cctcgtaatc attttcttgt atttatcgtc ttttcgctgt aaaaacttta tcacacttat 7020  
ctcaaataca cttattaacc gcttttacta ttatcttcta cgctgacagt aatatcaaac 7080  
agtgacacat attaaacaca gtggtttctt tgcataaaca ccatcagcct caagtcgtca 7140  
agtaaagatt tcgtgttcat gcagatagat aacaatctat atgttgataa ttagcgttgc 7200  
ctcatcaatg cgagatccgt ttaaccggac cctagtgcac ttacccacg ttcgggtccac 7260

tgtgtgccga acatgctcct tcactatittt aacatgtgga attaatctta aatcctcttt 7320  
atatgatctg ccgatagata gttctaagtc attgaggttc atcaacaatt ggattttctg 7380  
tttactcgac ttcaggtaaa tgaaatgaga tgatacttgc ttatctcata gtttaactcta 7440  
agaggtgata cttatittact gtaaaactgt gacgataaaa ccggaaggaa gaataagaaa 7500  
actcgaactg atctataatg cctatitttct gtaaagagtt taagctatga aagcctcggc 7560  
atitttgccg ctcttaggta gtgctittttt tccaaggaca aaacagtttc tttttcttga 7620  
gcaggtttta tgtttcggta atcataaaca ataaataaat tatttcattt atgtttaaaa 7680  
ataaaaaata aaaaagtatt tttaattttt aaaaaagttg attataagca tgtgaccttt 7740  
tgcaagcaat taaattttgc aatttgtgat tttaggcaaa agttacaatt tctggctcgt 7800  
gtaatatatg tatgctaaag tgaactttta caaagtcgat atggacttag tcaaaagaaa 7860  
ttttcttaaa aatatatagc actagccaat ttagcacttc tttatgagat atattataga 7920  
ctttattaag ccagatttgt gtattatatg tatttaccgc gcgaatcatg gacatacatt 7980  
ctgaaatagg taatattctc tatggtgaga cagcatagat aacctaggat acaagttaaa 8040  
agctagtact gttttgcagt aatttttttc ttttttataa gaatgttacc acctaaataa 8100  
gttataaagt caatagttaa gtttgatatt tgattgtaaa ataccgtaat atatttgcatt 8160  
gatcaaaagg ctcaatgttg actagccagc atgtcaacca ctatattgat caccgatata 8220  
tggaactcca caccaactag taatatgaca ataaattcaa gatattcttc atgagaatgg 8280  
cccaga 8286

<210> 5

<211> 3631

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

aagaccagat agtacagggc ctggctacaa aaatacaagc ttttactatg ctattgcaat 60  
actaaacgat aagcattagg atgttaagtg actcaggaaa taagattttg ggaaaaagta 120  
atctgcttat gtgcacaaaa tggattcaag tttgcagata aaataaaaata tggatgatga 180  
ttcaagggga cagatacaat ggttcaaacc caagaggagc agtgagtctg tggaattttg 240  
aaggatggac aaaggtgggg tgagaaagac atagtattcg acctgactgt gggagatgag 300

aaggaagaag gaggtgataa atgactgaaa gctcccagac tggtgaagat aacaggagga 360  
aaccatgcac ttgaccctgg tgactctcat gtgtgaaggg tagagggata ttaacagatt 420  
tacttttttag gaagtgctag attggtcagg gagttttgac cttcaggtct tgtgtctttc 480  
atatcaagga acctttgcat tttccaagtt agagtgccat attttgcaa atataacttt 540  
attagtaatt ttatagtgc ttcacattga tcagactttt tcctgtgaat tacttttgaa 600  
tttggctgta tatatccaga atatgggaga gagacaaata attattgtag ttgcaggcta 660  
tcaacaatac tggctctctct gagccttata acctttcaat atgccccata aacagagtaa 720  
acagggatta ttcattggcac taaatatattt cacctagggtc agtcaacaaa tggaggcaat 780  
gtgcattttt tgatacatat ttttatatat ttatggggca tgtgatactt acatgcctag 840  
aacatgtgac tgattaagtc tagatatatta ggatatccat tactttgagc atttatcatt 900  
tctatgtatt gagaaaattt caaatcctca tttctgacca ttttgaaata tataataaat 960  
agtaattaac tatagtcacc ctactcaa atcaacatta taaactaact aatccttctt 1020  
tccacttttt taccaaccaa catctcttaa atcccctgcc atacacatca cacatttttc 1080  
agctctgata actatcattc tactctcata ccaccatgag accacttttt tagctccaca 1140  
gatgaataaa aacatgtgat atttgacttt ctgtatctgg cttattttat tatctatctc 1200  
tttggcatac caagagtttg tttttgttct gcttcagggc tttcaattaa cataatgacc 1260  
tctggttcca tccatgttgc tacaaatgac aagatttcat tctttttcat ggcaaaatag 1320  
tactgtgcaa aaaatacaat tttttaatcc gttcatctgt tgatagacac ttaggttgat 1380  
cccaaacctt aactattgtg aatagggtgct tcaataaaca tgagtgtaat gtgtccattg 1440  
gatatactga tttcctttct tttggataaa taaccactag tgagattgct ggattgtatg 1500  
atagttctgt ttttagttta ttgagaaatc ttcatactgt tttccataat ggttgtacta 1560  
ttttacattc ccaccaacag tgtgtaagaa agagttccct tttctccata tcctcacaag 1620  
gatctgttat tttttgtctt ttttgtaaat agcattttta ctagagtaag tagatatctc 1680  
attgtagttt tgatttgcat ttcctgatc attagtgatg ttgagatttt ttcatatgtt 1740  
tgttggatcat ttgtatatct tttctgaga ttgtctgttc atgtccttat cctactttta 1800  
ttgggattgt tgttattttc ttgataatca ttgtgtcatt ttagagcctg gatattattc 1860  
ttttgtcaga tgtatagatt gtgaagattt tctcctctgt gggttgtctg tttattctgc 1920  
agactcttcc ttttgccatg caaaagctct ttagtttaaat ttagtcccag atattttctt 1980  
tgtttttatg tgtttgcatt tgtgttcttg tcatgaaatc ctttcctaag ccaatgtgta 2040

gaagggtttt tccgatgtta ttttctagaa ttgttacagt ttcaggctta gatttaagtc 2100  
cttgatccat ctttaagttga tttttgtata aggtgagaga tgaagatcca gtttcattct 2160  
cctacatgta gcttgccagc tatcccgact cathttgtga atagggtgcc ctttccatt 2220  
tatgtttttg tttgctttgt caaagatcag ttcggatgta agtatttgag tttatttctg 2280  
ggttctctat tctgttccat tgggtccgatg tgcctatttg tacaccagca tcatgctgtg 2340  
tttttggatga ctatggcctt attgtatagt ttgaaatgag gtaatgtaat gccattcaga 2400  
tttgttcttt tttttagact tgcttgttta ttgggctctt ttttggttcc ataagaattt 2460  
taggattgtt ttttctagtt ctgtgaaggc taatgggtgg atttatggga attgcaatgc 2520  
aattttagg ttgcttctgg cattatggcc attttcacaa tattgattct acccatctat 2580  
gagaatggca tgtgtttcca tttgtttgtg tcttatatga ttactatcag ccgtgttttg 2640  
tagttttcct tgtagatgtc tttcacctcc ttgggttaggt atatattcct aagtttttgt 2700  
tttgttttgt tttgtttttt gcagctattg taaaaggggt tgagttattg attttattct 2760  
catcttggtc attgctggta tgtaagaaag caactcattg gtgtacgtta attttgtatc 2820  
cagaaacttt gctgaattat tttatcagtt ctaggggggt ttggaggagt ctttagagtt 2880  
ttctacatac acaatcatat catcagcaaa cagtgcagc ttgactttct ctttaacaat 2940  
ttggatgtgc tttacttggt tctcttgtct gattgctctt gctaggactt ccagtaatat 3000  
gttaaagaga agtggtgaga gtgggtatcc ttgtctcatt ccagttttca gacagaatgc 3060  
ttttaacttt ttccattca atataatgtt ggctgtgtgt ttaccatagc tggcttttat 3120  
tacattgagg tatgtccttt gtaaaccgat tttgctgagt tttagtcata aagtgatgtt 3180  
gaattttgtt gaatgcagtt tctgtggcta ttgagataat cacatgattt ttgtttccaa 3240  
ttctctttat gttgtgtatc acacttattg acttgcgtat gttaaaccat ccgtgcatcc 3300  
ctcgcataaa accacttgat catgggtttt gatatgccgt gtgggatgct attagctata 3360  
ttttgtcaag gatgttggca tctatgttca tcagggatat tgatctgtag tgtttttttt 3420  
ttttggttat gttctttccc agttttggta ttaaggatgat actggcttca tagaatgatt 3480  
tagggaggat tctctctttc tctatcttgt agaatactgt caataggatt ggtatcaatt 3540  
cttctttgaa tgtctggtag aattcgaacg tctcctttag gttttctagt ttattcatgt 3600  
aaagtggtc atagtaacct tgaataatct t 3631

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 3386

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

tgctaattgct tcattacaaa cttatatcct ttaattccag atgggggcaa agtatgtcca 60  
ggggtgagga acaattgaaa catttgggct ggagtagatt ttgaaagtca gctctgtgtg 120  
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tcagcgtgtg tttcttttaa cgtcttcagc ctacaacata 180  
cagggttcat ggtgggaaga agatagcaag atttaaatta tggccagtga ctagtgcctt 240  
aaggggaaca actacctgca tttaatggga aggcaaaatc tcaggctttg aggggaagtt 300  
acataggctt gattctgggt ggaagctggg tgtgtagtta tctggaggcc aggctggagc 360  
tctcagctca ctatgggttc atctttattg tctcctttca tctcaacagc tcctgggaaa 420  
tgtgctggtg accgttttgg caatccattt cggcaaagaa ttcaccctg aggtgcaggc 480  
ttcctggcag aagatggtga ctgcagtggc cagtgccctg tcctccagat accactgagc 540  
ctcttgccca tgattcagag ctttcaagga taggctttat tctgcaagca atacaaataa 600  
taaacttatt ctgctgagag atcacacatg attttcttca gctctttttt ttacatcttt 660  
ttaaatatat gagccacaaa gggtttatat tgagggaagt gtgtatgtgt atttctgcat 720  
gcctgtttgt gtttgtggtg tgtgcatgct cctcatttat ttttatatga gatgtgcatt 780  
ttgatgagca aataaaagca gtaaagacac ttgtacacgg gagttctgca agtgggagta 840  
aatggtgttg gagaaatccg gtgggaagaa agacctctat aggacaggac ttctcagaaa 900  
cagatgtttt ggaagagatg ggaaaagggt cagtgaagac ctgggggctg gattgattgc 960  
agctgagtag caaggatggt tcttaatgaa gggaaagtgt tccaagcttt aggaattcaa 1020  
ggtttagtca ggtgtagcaa ttctatttta ttaggaggaa tactatttct aatggcactt 1080  
agctttttcac agcccttgtg gatgcctaag aaagtgaat taatcccatg ccctcaagtg 1140  
tgcagattgg tcacagcatt tcaagggaga gacctcattg taagactctg ggggaggtgg 1200  
ggacttaggt gtaagaaatg aatcagcaga ggctcacaag tcagcatgag catgttatgt 1260  
ctgagaaaca gaccagcact gtgagatcaa aatgtagtgg gaagaatttg tacaacatta 1320  
attggaaggt ttacttaatg gaatttttgt atagttggat gttagtgcatt ctctataagt 1380  
aagagtttaa tatgatggtg ttacggacct ggtgtttgtg tctcctcaaa attcacatgc 1440  
tgaatcccca actcccaact gaccttatct gtgggggagg cttttgaaaa gtaattaggt 1500

ttagctgagc tcataagagc agatcccat cataaaatta ttttccttat cagaagcaga 1560  
gagacaagcc atttctcttt cctcccgtg aggacacagt gagaagtccg ccatctgcaa 1620  
tccaggaaga gaaccctgac cagagtcag ccttcagaaa tgtgagaaaa aactctgttg 1680  
ttgaagccac ccagtctttt gtattttgtt atagcacctt aacttgagta aggcagatga 1740  
agaaggagaa aaaaataagc ttgggttttg agtgaactac agaccatgtt atctcaggtt 1800  
tgcaaagctc cctcgtccc ctatgtttca gcataaaata cctactctac tactctcacc 1860  
tataagacc aaataataag cctgcgccct tctctctaac ttgtatttct cctattttta 1920  
cttcaacatg ctttactcta gccttgtaat gtctttacat acagtgaat gtaaagtctt 1980  
ttattctttt tttctttctt tcttttttct cctcagcctc agaatttggc acatgccctt 2040  
ccttctttca ggaacttctc caacatctct gcctggctcc atcatatcat aaaggtccca 2100  
cttcaaatgc agtcaactacc gtttcaggat atgcactttc tttctttttt gttttttgtt 2160  
ttttttaagt caaagcaaat ttcttgagag agtaaagaaa taaacgaatg actactgcat 2220  
aggcagagca gccccgaggg ccgctgggtg ttccttttat gggtatttct tgatgatatg 2280  
ttaaacaagt ttggattat ttatgccttc tcttttttagg ccatataggg taactttctg 2340  
acattgcat ggcatgtttc ttttaattta atttactgtt accttaaat caggggtaca 2400  
cgtacaggat atgcaggttt gttttatagg taaaagtgtg ccatgggttt aatgggtttt 2460  
tttttcttg taaagtgtt taagtctctt gtttactctg gatattggcc ttgtcagaa 2520  
gaatagattg gaaaatcttt ttccattct gtagattgtc tttcgtctg atggtagttt 2580  
cttttctga gcaggagctc tttagtttaa ttagattcca ttggtcaatt ttgtctttg 2640  
ctgcaattgc ttttcacgtt ttcatcatga aatctgtgcc cgtgtttata tcatgaatag 2700  
tattgccttg attttttctt aggcttttta tagtttgggg ttttcatctt aagtctctaa 2760  
tccatccgga gtttaatttg gataaggtat aaggaaggag tccagtttca tttttcagca 2820  
tatggctagc cagttctccc ccatcttta ttaaattgaa aatcctttcc cattgcttg 2880  
cttttctcag gtttctaaaa gacagatggg ttaggttaca atatgcagtt tcttcaagtc 2940  
atataatacc atctgaaatc tcttattaat tcatttcttt tagtatgtat gctggctctc 3000  
tctgctcact atagtgaggg caccattagc cagagaatct gtctgtctag ttcatgtaag 3060  
attctcagaa ttaagaaaaa tggatggcat atgaatgaaa cticattgat gacatatgga 3120  
atctaattgt tattttgtga attaatgcat aagatgcaac aagggaagg ttgacaactg 3180  
cagtataac ctggtattga tgatataaga gtctatagat cacagtagaa gcaataatca 3240

tggaaaacaa ttggaaatgg ggaacagcca caaacaagaa agaatcaata ctaccaggaa 3300  
agtgactgca ggtcactttt cctggagcgg gtgagagaaa agtgggaagtt gcagtaactg 3360  
ccgaattcct ggttggctga tggaaa 3386

<210> 7

<211> 2838

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gtgtaagaag gttcctgagg ctctacagat agggagcact tgtttatttt acaaagagta 60  
catgggaaaa gagaaaagca agggaaccgt acaaggcatt aatgggtgac acttctacct 120  
ccaaagagca gaaattatca agaactcttg atacaaagat aatactggca ctgcagaggt 180  
tctagggag acctcaaccc taagacatag cctcaagggt aatagctacg attaaactcc 240  
aacaattact gagaaaataa tgtgctcaat taaaggcata atgattactc aagacaatgt 300  
tatgttgtct ttcttctctc ttctttgcc tgcacattgt agcccataat actatacccc 360  
atcaagtgtt cctgctccaa gaaatagctt cctcctctta cttgccccag aacatctctg 420  
taaagaattt cctcttatct tcccatatit cagtcaagat tcattgctca cgtattactt 480  
gtgacctctc ttgaccccag ccacaataaa ctctctata ctacccaaaa aatctttcca 540  
aacctcccc gacaccatat ttttatatit ttcttattta tttcatgcac acacacacac 600  
tccgtgcttt ataagcaatt ctgcctattc tctaccttct tacaatgcct actgtgcctc 660  
atattaaatt catcaatggg cagaaagaaa atatttattc aagaaaacag tgaatgaatg 720  
aacgaatgag taaatgagta aatgaaggaa tgattattcc ttgctttaga acttctggaa 780  
ttagaggaca atattaataa taccatcgca cagtgtttct ttgttgtaa tgctacaaca 840  
tacaaagagg aagcatgcag taaacaaccg aacagttatt tcctttctga tcataggagt 900  
aatatTTTTT tccttgagca catttttggc ataggtaaaa ttagaaggat ttttagaact 960  
ttctcagttg tatacatttt taaaaatctg tattatatgc atgttgatta attttaaact 1020  
tacttgaata cctaaacaga atctgttggt tccttggtgt tgaaagtgtt ttcacagtaa 1080  
ctctgtctgt actgccagaa tatactgaca atgtgttata gttaactgtt ttgatcaca 1140  
cattttgaat tgactggcag cagaagctct ttttatatcc atgtgttttc ctttaagtc 1200

tatacatagt aggcattgaga ctctttatac tgaataagat atttaggaac cactgggttta 1260  
catatcagaa gcagagctac tcagggcatt ttggggaaga tcactttcac attcctgagc 1320  
atagggaagt tctcataaga gtaagatatt aaaaggagat acttgtgtgg tattcgaaag 1380  
acagtaagag agattgtaga ccttatgatac ttgataggga aaacaaacta cattcctttc 1440  
tccaaaagtc aaaaaaaaaag agcaaatata gcttactata ccttctattc ctacaccatt 1500  
agaagtagtc agtgagtcta ggcaagatgt tggccctaaa aatccaaata ccagagaatt 1560  
catgagaaca tcacctggat gggacatgtg ccgagcaaca caattactat atgctaggca 1620  
ttgctatctt catattgaag atgaggaggt caagagatga aaaaagactt ggcaccttgt 1680  
tgttatatta aaattatttg ttagagtaga gcttttgtaa gagtctagga gtgtgggagc 1740  
taaagatga tacacatgga cacaaagaat agatcaacag acaccaggc ctacttgagg 1800  
gttgagggtg ggaagaggga gacgatgaaa aagaacctat tgggtattaa gttcatcact 1860  
gagtgatgaa ataactgtga catcaagacc cagtgatatg caatttacct atataacttg 1920  
tacatgtacc cccaaattta aaataaagtt aaaacaaagt ataggaatgg aattaattcc 1980  
tcaagatttg gctttaattt tatttgataa tttatcaaat ggttgttttt cttttctcac 2040  
tatggcgttg ctttataaac tatgttcagt atgtctgaat gaaagggtgt gtgtgtgtgt 2100  
gaaagagagg gagagaggaa gggaagagag gacgtaataa tgtgaatttg agttcatgaa 2160  
aatttttcaa taaaataatt taatgtcagg agaattaagc ctaatagtct cctaaatcat 2220  
ccatctcttg agcttcagag cagtcctctg aattaatgcc tacatgtttg taaagggtgt 2280  
tcagactgaa gccaagattc tacctctaaa gagatgcaat ctcaaattta tctgaagact 2340  
gtacctctgc tctccataaa ttgacaccat ggcccactta atgagggtta aaaaaagcta 2400  
attctgaatg aaaatctgag ccagtgagg gaaatattaa tgaacaaggt gcagactgaa 2460  
atataaatit tctgtaataa ttatgcatat actttagcaa agttctgtct atgttgactt 2520  
tattgctttt ggtaagaaat acaacttttt aaagtgaact aaactatcct atttccaaac 2580  
tattttgtgt gtgtgcggtt tgtttctatg ggttctgggt ttcttgaggc atttttatit 2640  
cattttaatt aattaattct gagagctgct gagttgtgtt tactgagaga ttgtgtatct 2700  
gcgagagaag tctgtagcaa gtagctagac tgtgcttgac ctaggaacat atacagtaga 2760  
ttgctaaaat gtctcacttg gggaatttta gactaaacag tagagcatgt ataaaaatac 2820  
tctagtcaag tgctgctt 2838



<210> 8

<211> 6

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ttaggg 6

<210> 9

<211> 1884

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gtatacatatc atactgaat atggaatcaa atatTTTTtct aagatgaaac agtcatgatt 60  
tatttcaaata aggtacggat aagtagatat tgaggtaagc attaggtctt atattatgta 120  
acactaatct attactgcgc tgaaactgtg gtctttatga aaattgtttt cactacacta 180  
ttgagaaaatt aagagataat ggcaaaagtc acaaagagta tattcaaaaa gaagtatagc 240  
actttttcct tagaaaccac tgctaactga aagagactaa gatttgtccc gtcaaaaatc 300  
ctggacctat gcctaaaaca catttcacaa tccctgaact tttcaaaaat tgggtacatgc 360  
tttagcttta aactacaggc ctactggag ctacagacaa gaaggtaaaa aacggctgac 420  
aaaagaagtc ctggtatcct ctatgatggg agaaggaaac tagctaaagg gaagaataaa 480  
ttagagaaaa actggaatga ctgaatcgga acaaggcaaa ggctataaaa aaaattaagc 540  
agcagtatcc tcttgggggc cccttccca cactatctca atgcaaataat ctgtctgaaa 600  
cggctccctgg ctaaactcca cccatgggtt ggccagcctt gccttgacca atagccttga 660  
caaggcaaac ttgaccaata gtcttagagt atccagtga gccaggggcc ggcggctggc 720  
tagggatgaa gaataaaagg aagcaccctt cagcagttcc acacactcgc ttctggaacg 780  
tctgagatta tcaataagct cctagtccag acgcatggg tcatttcaca gaggaggaca 840  
aggctactat cacaagcctg tggggcaagg tgaatgtgga agatgctgga ggagaaaccc 900  
tgggaaggta ggctctggtg accaggacaa gggagggaag gaaggaccct gtgcctggca 960  
aaagtccagg tcgcttctca ggatttgtgg caccttctga ctgtcaaact gttcttgtca 1020

atctcacagg ctctggttg tctacccatg gacccagagg ttctttgaca gctttggcaa 1080  
cctgtcctct gcctctgcca tcatgggcaa ccccaaagtc aaggcacatg gcaagaaggt 1140  
gctgacttcc ttgggagatg ccataaagca cctggatgat ctcaagggca cctttgcca 1200  
gctgagttaa ctgcactgtg acaagctgca tgtggatcct gagaacttca aggtgagtcc 1260  
aggagatgtt tcagcactgt tgcctttagt ctcgaggcaa cttagacaac tgagtattga 1320  
tctgagcaca gcagggtgtg agctgtttga agatactggg gttgggagtg aagaaactgc 1380  
agaggactaa ctgggctgag acccagtggc aatgttttag ggcctaagga gtgcctctga 1440  
aaatctagat ggacaacttt gactttgaga aaagagaggt ggaaatgagg aaaatgactt 1500  
ttctttatta gatttcggta gaaagaactt tcacctttcc cctatTTTTTg ttattcgttt 1560  
taaaacatct atctggaggc aggacaagta tggtcgttaa aaagatgcag gcagaaggca 1620  
tatattggct cagtcaaagt ggggaacttt ggtggccaaa catacattgc taaggctatt 1680  
cctatatcag ctggacacat ataaaatgct gctaattgctt cattacaaac ttatatcctt 1740  
taattccaga tgggggcaaa gtatgtccag gggtgaggaa caattgaaac atttgggctg 1800  
gagtagatTTT tgaagtcag ctctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt cagcgtgtgt 1860  
ttcttttaac gtcttcagcc taca 1884

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 10

aagaccagat agtacagggc ctggctac 28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 11

aagattattc aaggttacta tgaacacc 28

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 12

tgctaattgct tcattctagaa acttatatcc tttaattc 38

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 13

tttcactcg agccaaccag gaattcggca gttac 35

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 14

gtgtaagaag gttctctaga ggctctacag atagggag 38

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15

aagcagcact tgactcgagt atttttatac atgctctac 39

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 16

gtatacatac atacctgaat atg 23

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 17

tgtaggctga agacgttaaa agaaacac 28

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は形質転換株内におけるコトランスフェクトBACの運命についてまとめた表である。GCH1-BACに加えてCMV/ $\alpha$ 100BAC又はSV/ $\alpha$ 50BACを用いたコトランスフェクションによって得られたBS耐性細胞株をFISHで解析した結果が示される。「HAC上」は、 $\alpha$ 21-IアルフォイドDNAプローブとBACベクタープローブの両方で検出された人工染色体を保有する細胞株を示す。これらの細胞株のメタフェイズ・スプレッドの95%以上においてそれぞれ一つのHACが検出された。残りの細胞では、導入されたBACはHT1080の染色体に組込まれたか（染色体上）、又はFISH解析においてシグナルが検出できなかった（検出されず）。「GCHを保有するHAC」は、GCH1遺伝子のシグナルが認められたHACを保有する細胞株を示す。

【図 2】 図 2 はHAC保有細胞株におけるGCH1活性の測定結果をまとめた表である。IFN- $\gamma$  誘導の存在下、及び非存在下においてHT/GCH2-10、HT/GCH5-18及びHT1080細胞におけるGCH1活性を測定した結果が示される。表中の各データはこれら三つの独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準偏差で表されている。

【図 3】 図 3 はアルフォイドBAC及びGCH1-BACのコンストラクトを示す図である。CMV/ $\alpha$ 100 BACは、BACベクター内にヒト21番染色体由来の100kbの $\alpha$ 21-Iアルフォイド配列、及び哺乳類細胞を選択するためのCMV-Bsd（アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) 由来のBlasticidin Sデアミナーゼ遺伝子) 選択マーカを含む。SV/ $\alpha$ 50 BACは、50kbの $\alpha$ 21-Iアルフォイド配列、及びSV2-Bsr（バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 由来のBlasticidin Sデアミナーゼ遺伝子) 選択マーカを含む。GCH1-BACはGCH1遺伝子を含む180 kbのゲノムDNA断片を含む。FISH解析用、サザン解析用、及びGCH1遺伝子のエクソン（1～6）用のプローブとして使用された領域は、それぞれハッチングを施したボックス、黒塗りのボックス、及び白抜きのボックスで表される。BACベクターはE.coli内での選択のためのクロラムフェニコール耐性遺伝子（Cm）を含む。

【図 4】 図 4 はHAC上のGCH1シグナルを検出するためのFISH解析の結果を示す図である。HT/GCH2-10細胞株（CMV/ $\alpha$ 100 BACとGCH1-BACのコトランスフェクションによって形成された）、及びHT/GCH5-18（SV/ $\alpha$ 50 BACとGCH1-BACのコトランスフェクションによって形成された）にGCH1エクソン1プローブ（緑）及びBAC

ベクタープローブ (赤) を (左欄) 、又はGCH1エクソン4-6 (緑) 及びGCH1エクソン1 (赤) を (右欄) ハイブリダイズさせている。矢じりはHACを示す。

【図 5】 図 5 はGCH1-HACの構造解析の結果を示す図である。HAC内のGCH1遺伝子を制限酵素分析した結果が示される。HT/GCH2-10 、HT/GCH5-18 、及びトランスフェクションを行っていないHT1080から調製したゲノムDNAをBamHI (A) 又はStuI (B) で消化し、常法的なゲル電気泳動で分画した。内在性GCH1遺伝子座及びGCH1-BACを使用した場合に、USプローブ (A) 及びエクソン6プローブ (B) によって検出されるBamHI断片及びStuI断片の予想されるサイズが上段に示される。

【図 6】 図 6 はドットハイブリダイゼーションによるHAC内のGCH1-BAC及びアルフォイドBACのコピー数の推定に用いたグラフ図である。左欄はGCH1エクソン6プローブで得られた強度値である。GCH1-BAC (0.4, 0.2, 0.2ng) の入力DNAと、HT1080、HT/GCH2-10及びHT/GCH5-18からそれぞれ調製したゲノムDNA (1.0, 0.5  $\mu$ g) とをGCH1エクソン6プローブとハイブリダイズさせた。0.1ngのGCH1-BAC DNAの強度値を基準値として使用した。右欄はBACベクタープローブで得られた強度値である。GCH1-BAC (0.5, 0.1, 0.05ng) と、HT1080、HT/GCH2-10及びHT/GCH5-18からそれぞれ調製したのゲノムDNA (0.5, 0.25  $\mu$ g) とをBACベクタープローブとハイブリダイズさせた。各プローブで得られたシグナル強度はフジ・イメージアナライザーBAS1000を使用して決定した。

【図 7】 図 7 はHAC保有細胞株とマウスA9細胞との細胞融合によって得られたハイブリッド細胞をFISH解析した結果を示す図である。HT/GCH5-18細胞株をPEGを利用してA9細胞と融合させた。BS耐性及びウワバイン耐性の細胞株をFISHで解析した。メタフェイズ・スプレッドをBACベクタープローブ (赤) 及びAlu反復配列プローブ (緑) と (A) 、又はBACベクタープローブ (緑) 及びマウス・マイナーサテライトプローブ (赤) と (B) ハイブリダイズさせた。矢印はHACを示す。

【図 8】 図 8 (A) はA201F4.3 (1レーン及び2レーン) 及び7c5hTEL (3レーン及び4レーン) をPEGEで分析した結果を示す図である。宿主の染色体に加えて150kb又は100kbにグロビン又はアルフォイドYACが存在するのが認められる (1レーン及び3レーン) 。YACを精製、濃縮し (2レーン及び4レーン) 、混合したYAC (5レーン) をHT-1080細胞に導入した。図中のMは分子量マーカーを示す。図 8 (B) はY

ACの導入によって得られた形質転換株に対するFISH解析の結果を示す図である。形質転換株に認められたミニ染色体が矢印で示される（上段）。また、YACの腕部（緑色：矢じり）とアルフォイド（赤色：矢印）のシグナルが存在する（下段）。DAPIで染色している（青色）。

【図 9】 図 9 はミニ染色体を保有する形質転換株に対するFISH解析の結果を示す図である。プローブとしてYACの腕部（緑色、矢じり）及びアルフォイド（赤色、矢印）を用いた結果（左上）、同図下段に示される  $\beta$  グロビンのA（緑、矢じり）及びアルフォイド（赤、矢印）を用いた結果（右上）、 $\beta$  グロビンのB（緑、矢じり）及びアルフォイド（赤、矢印）を用いた結果（左下）、 $\beta$  グロビンのC（緑、矢じり）及びアルフォイド（赤、矢印）を用いた結果（右下）である。

【図 10】 図 10 はミニ染色体を保有する形質転換株である二つのクローン（C11及びC29）に対してヒト  $\beta$  グロビンプローブ（配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 9）又はテロメア反復配列（配列番号 8 の配列が繰り返されてなる約 500bp の配列）をプローブとして行ったFISH解析の結果を示す図である。青、緑、赤はそれぞれDAPI、ヒト  $\beta$  グロビン、テロメアのシグナルである。

【図 11】 図 11 はA9細胞とミニ染色体保有細胞の融合により得られた形質転換細胞のFISH解析結果を示す図である。左上欄はDAPI（青）による染色結果、右上欄はヒト  $\beta$  グロビンプローブ（配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 9 の混合）によるシグナル（緑）を検出した結果、左下欄はアルフォイドプローブ（配列番号 3）によるシグナル（赤）を検出した結果、右下欄はこれらを重ね合わせたものである。アルフォイドのシグナルはミニ染色体にのみ認められる。

【図 12】 ミニ染色体のファイバーFISH解析の結果を示す図である。上段は  $\beta$  グロビンプローブ（配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 9 の混合）を用いた結果、中段はアルフォイドプローブ（配列番号 3）を用いた結果、下段は以上の二つの結果を重ね合わせたものである。アルフォイド及び  $\beta$  グロビンの各シグナルはそれぞれ赤及び緑で表される。

【書類名】

図面

【図 1】

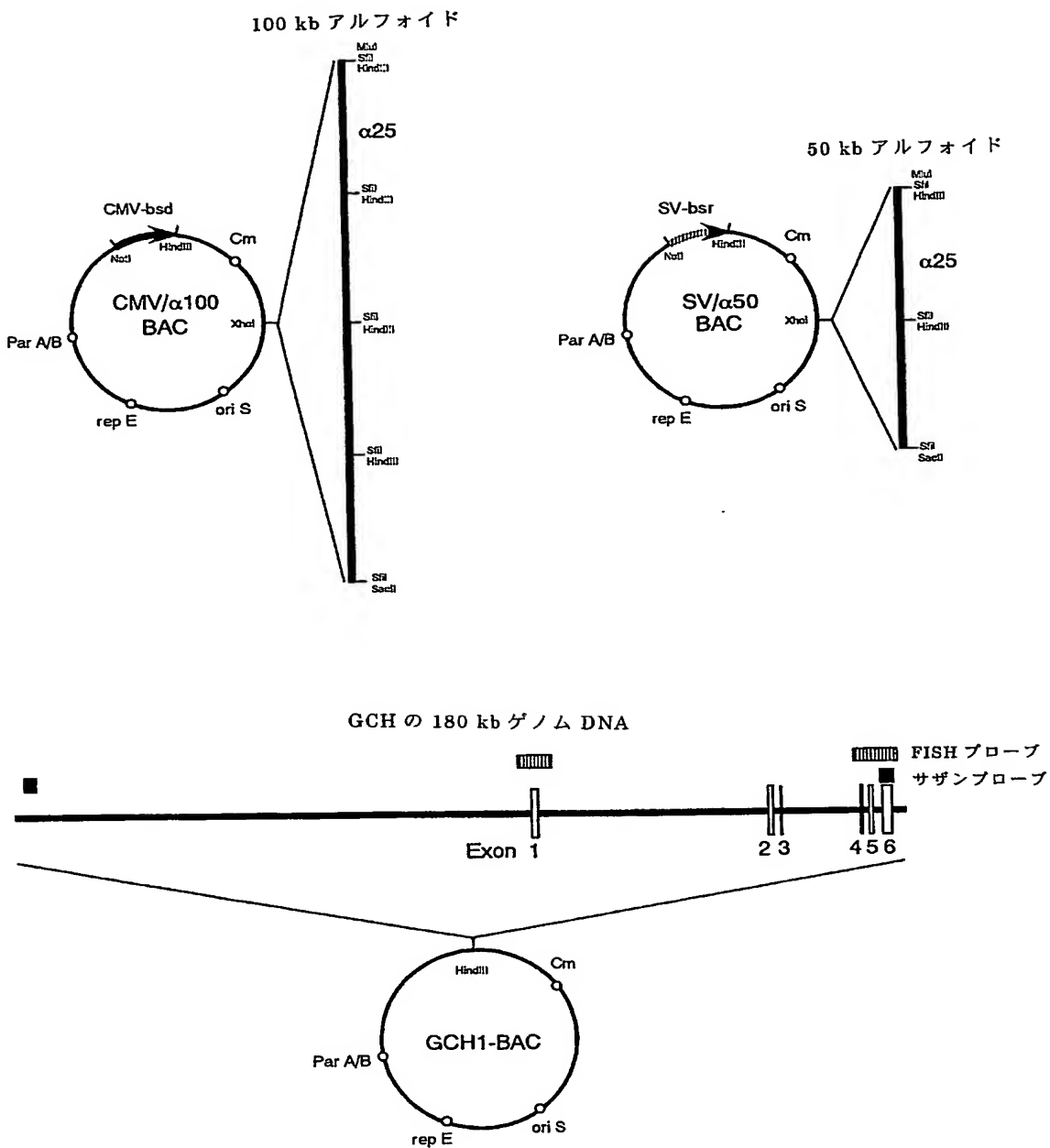
導入BACs	検査されたBS <sup>+</sup> 細胞株	アルフォイド及びBACシグナル			GCH1を保有するHAC
		HAC上	染色体上	検出されず	
CMV/ $\alpha$ 100 BAC +GCH1-BAC	16	1	4	11	1 (HT/GCH2-10)
SV/ $\alpha$ 50 BAC +GCH1-BAC	17	3	13	1	1 (HT/GCH5-18)

【図 2】

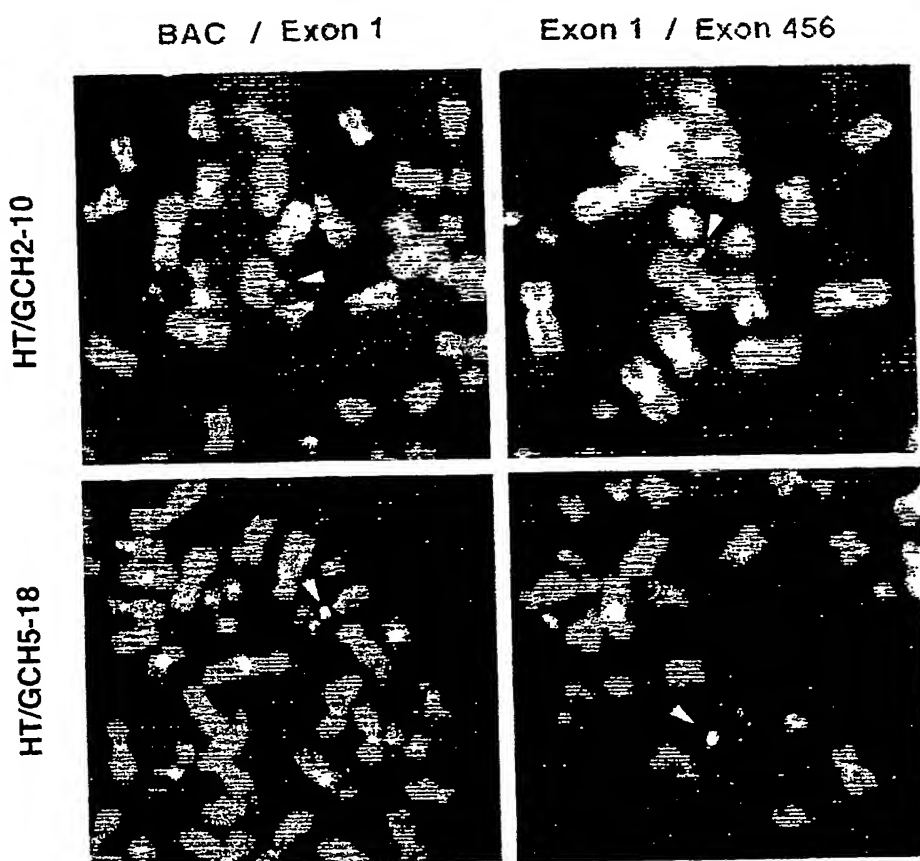
細胞株	GCH1活性 (pmol/h/mg タンパク質)		増加割合
	- IFN	+ IFN	
HT1080	0.05 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.03	15
HT/GCH2-10	0.16 $\pm$ 0.02	5.0 $\pm$ 0.2	31
HT/GCH5-18	3.4 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.6	4.8



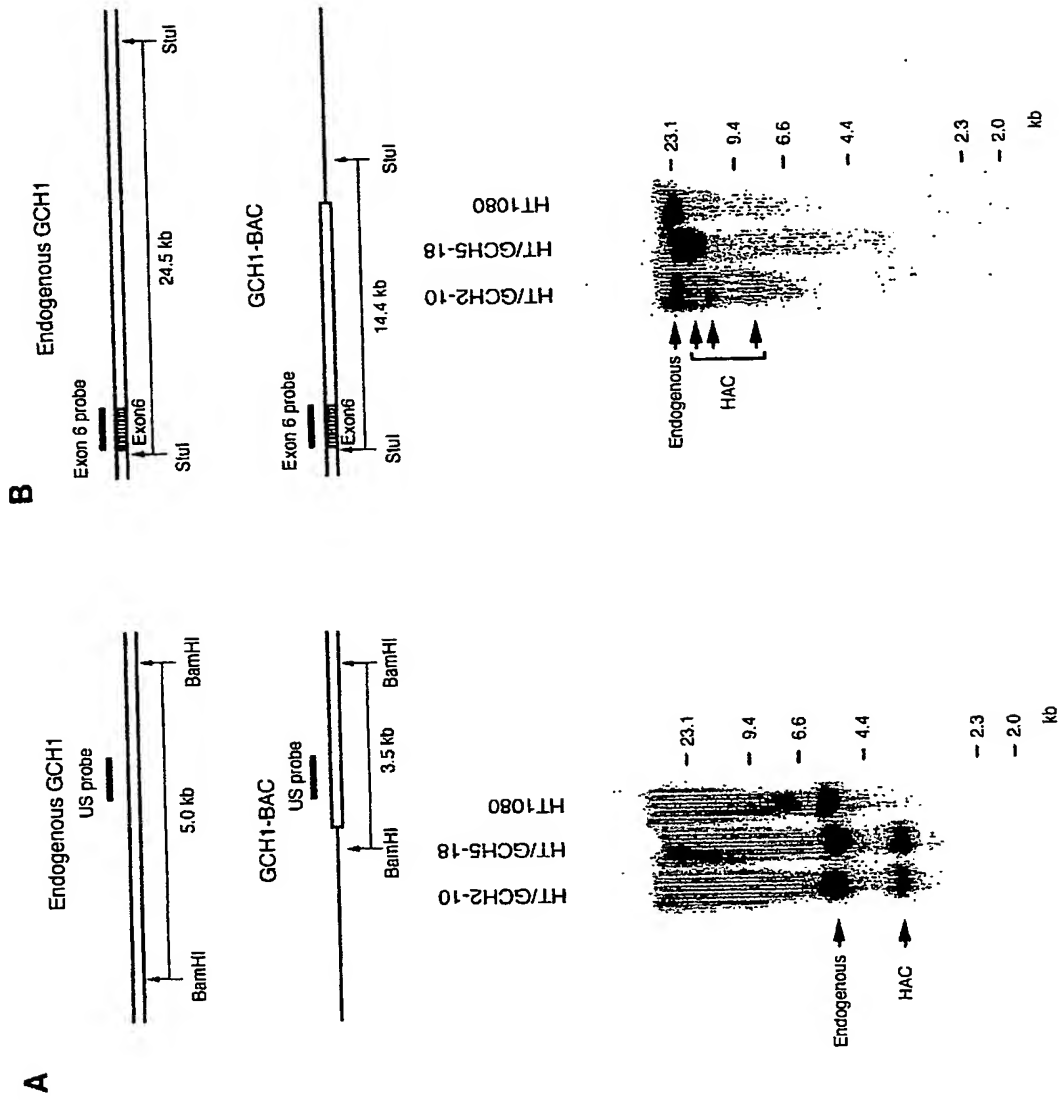
【図 3】



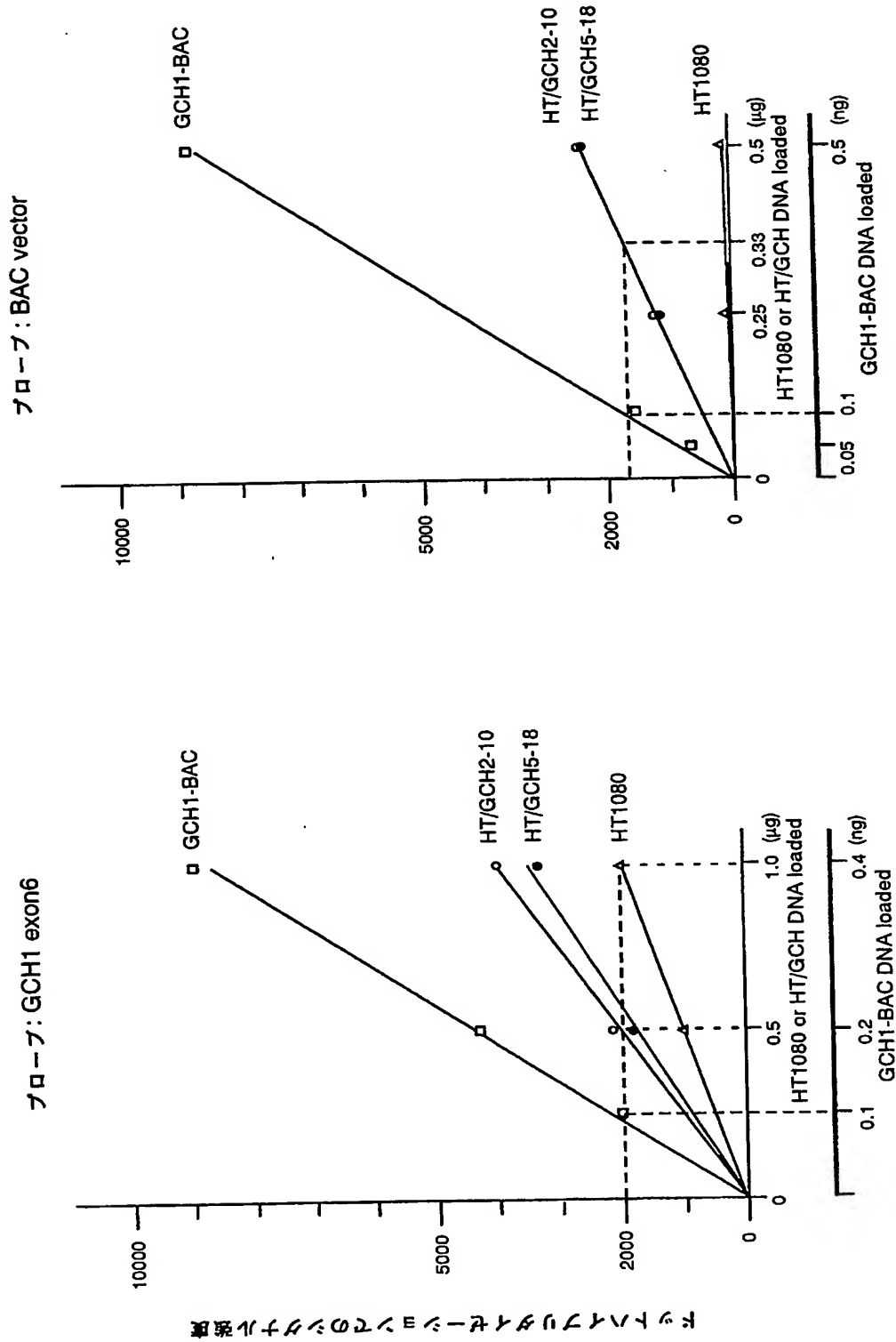
【図 4】



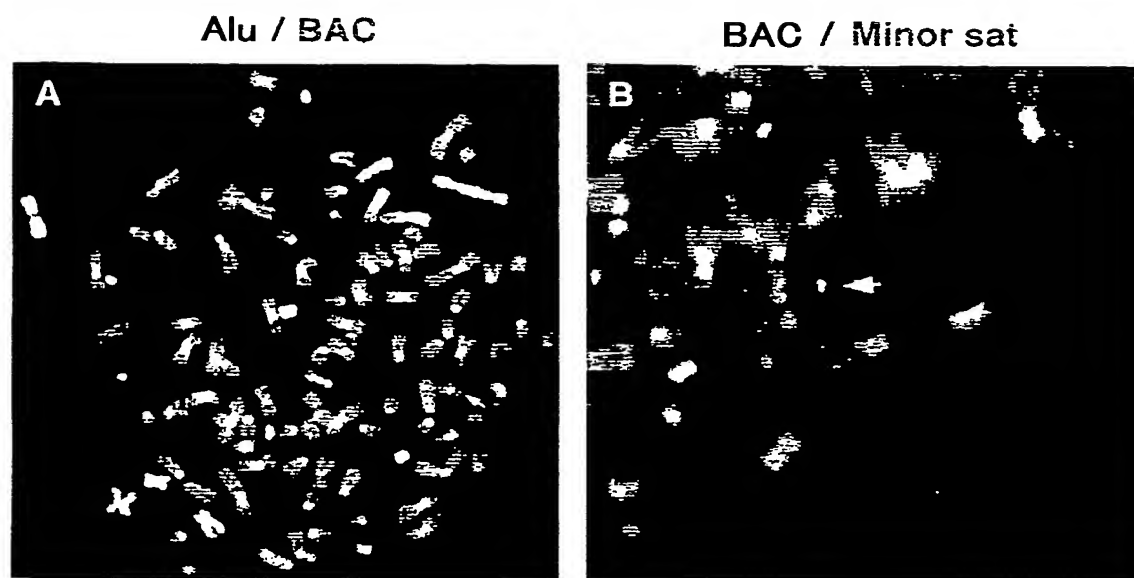
【図 5】



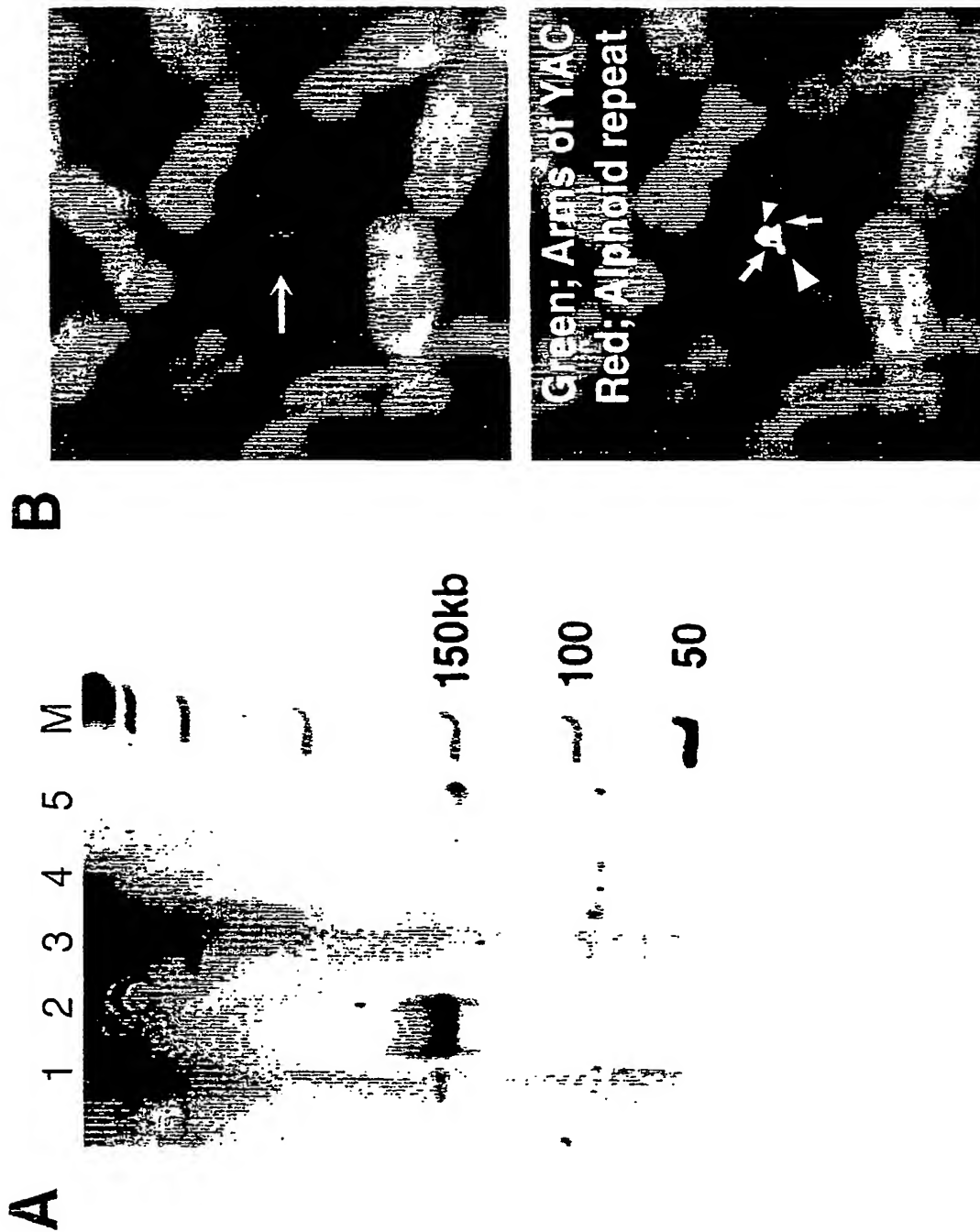
【図 6】



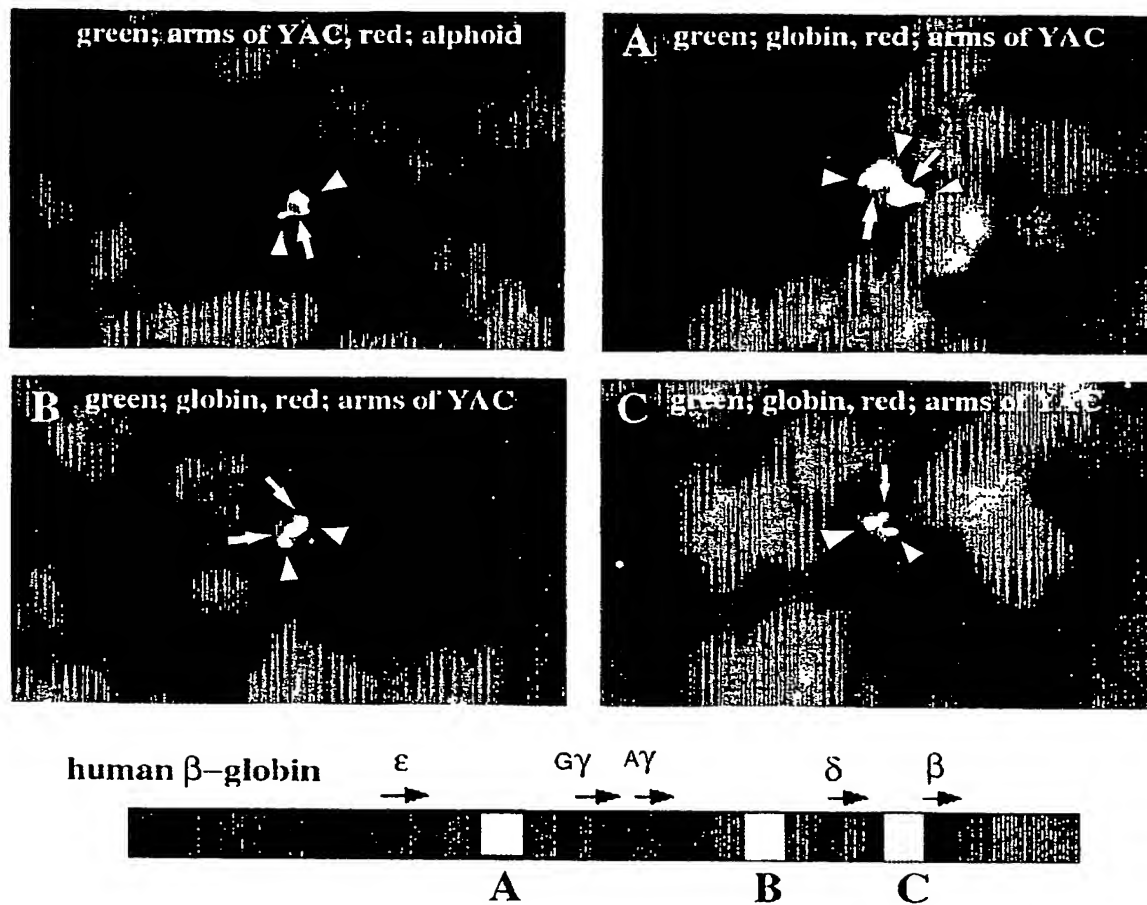
【図 7】



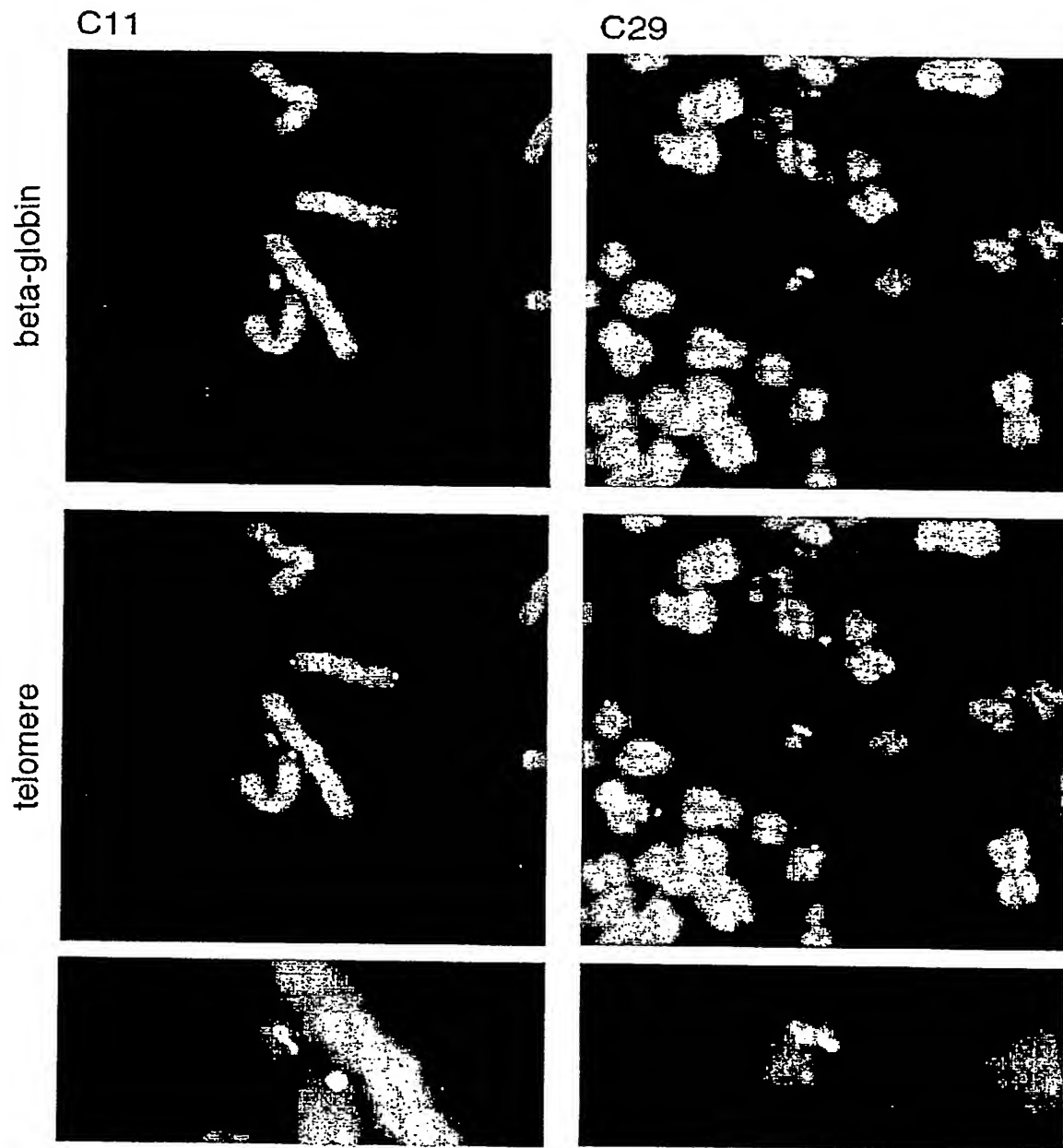
【図 8】



【図 9】

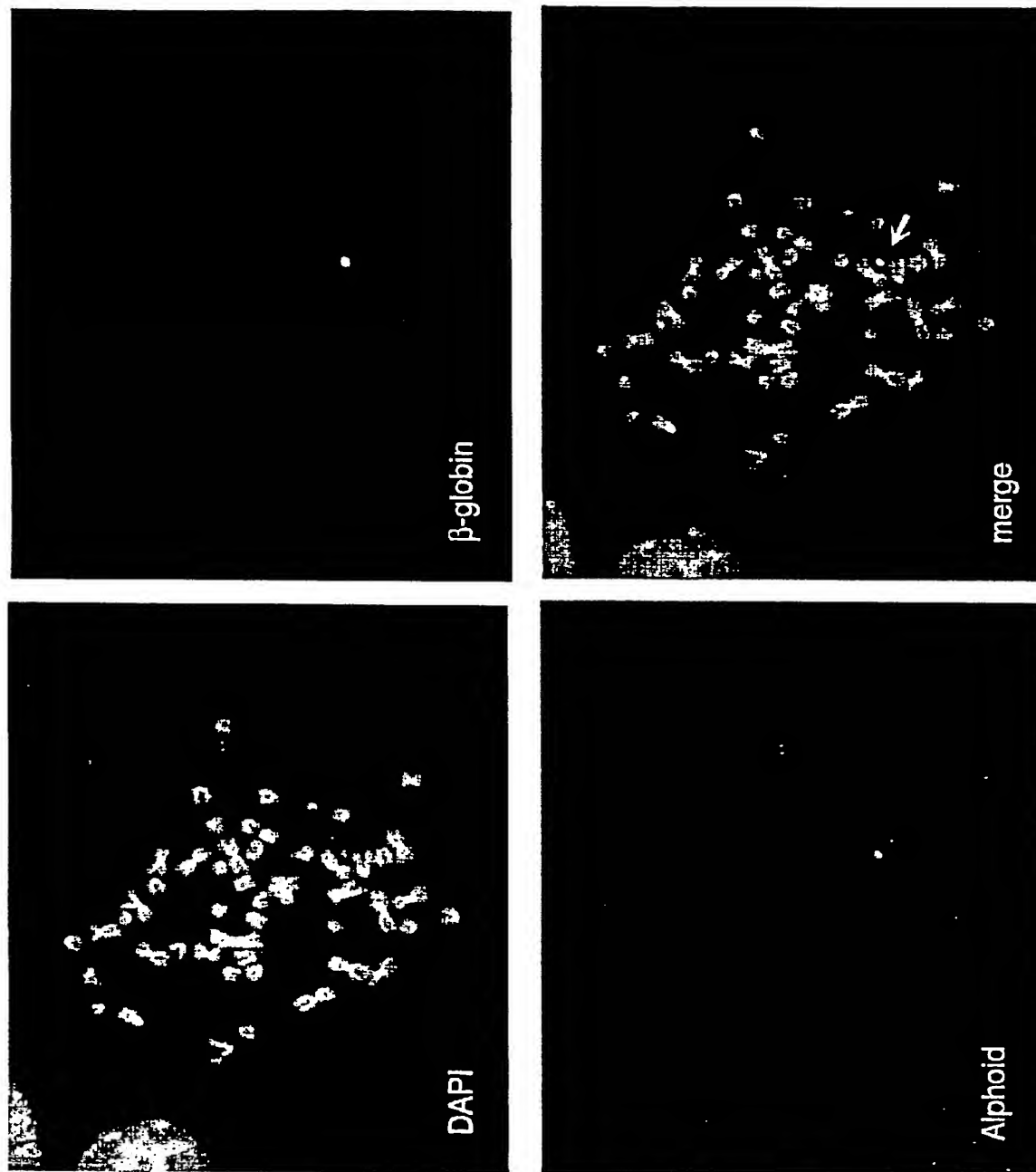


【図 10】

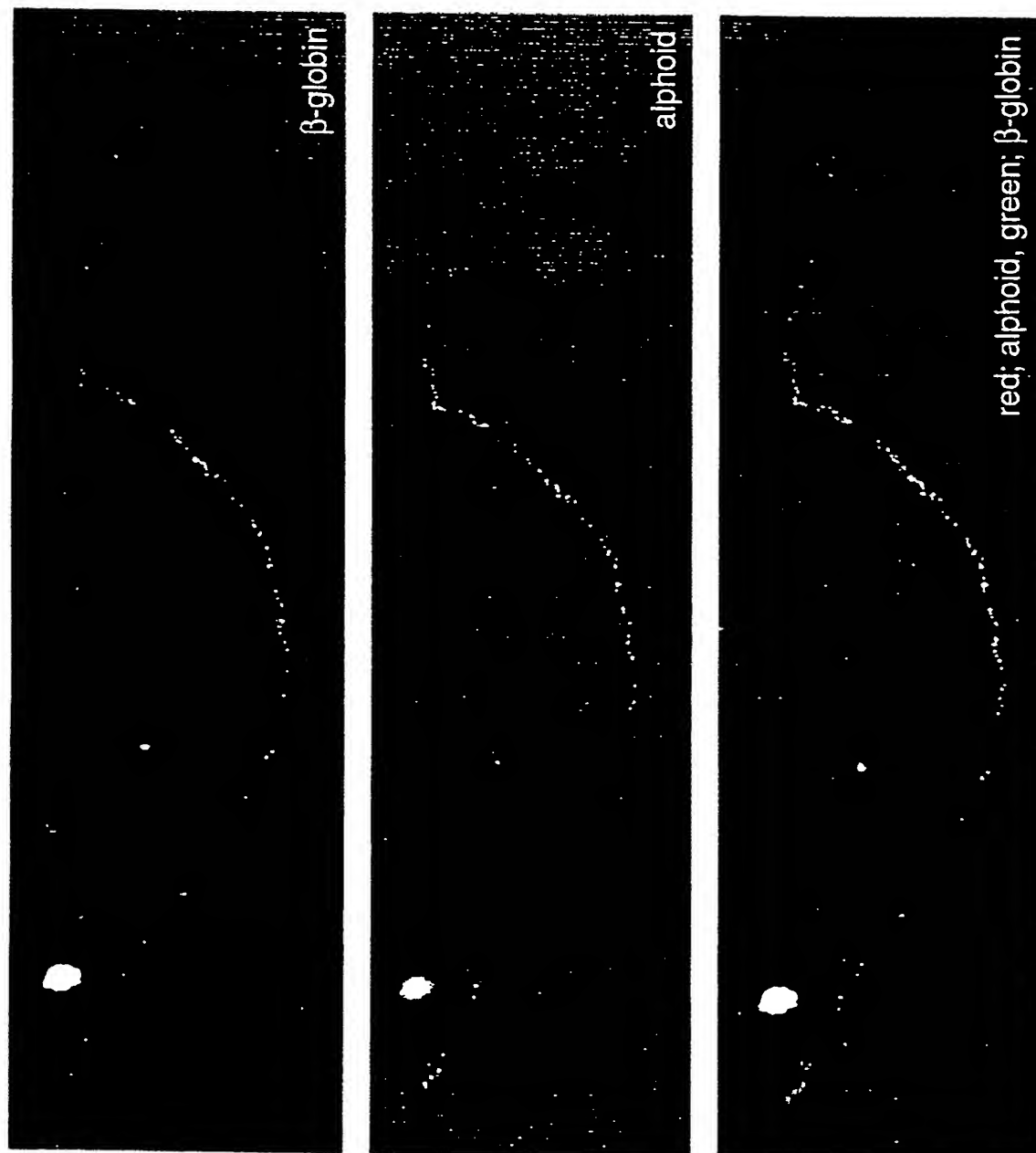




【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 哺乳類細胞内で安定的に維持され、それが保持する目的遺伝子の発現が効率的に行われ得る哺乳類人工染色体を提供する。

【解決手段】 哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第 1 ベクターと、機能配列を含む環状の第 2 ベクターとを哺乳類宿主細胞に導入し、前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換体を選択し、選択された形質転換体の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択することにより、

哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体を構築する。

【選択図】 図 3

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 5 8 1 1 4
受付番号	5 0 2 0 1 3 1 6 3 1 8
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 9 月 4 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年 9月 3日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-258114

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**